

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 4 月 8 日 (08.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/029248 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, 5/10, C12P 21/02, C07K 14/47, 7/06, 16/18, A61K 38/17, 38/08, 39/395

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012037

(22) 国際出願日: 2003 年 9 月 19 日 (19.09.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-282345 2002 年 9 月 27 日 (27.09.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒541-8510 大阪府 大阪市 中央区道修町 2 丁目 2-8 Osaka (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 佐藤 昇志 (SATO, Noriyuki) [JP/JP]; 〒062-0042 北海道 札幌市 豊平区福住 2 条 9 丁目 1 3-3 Hokkaido (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 塚原 智英 (TSUKAHARA, Tomohide) [JP/JP]; 〒060-0003 北海道 札幌市 中央区北 3 条西 1 8 丁目 2 の 1 Hokkaido (JP). 鍋田 裕樹 (NABETA, Yuki) [JP/JP]; 〒063-0802 北海道 札幌市 西区二十四軒 2 条 2 丁目 1-5-1 O Hokkaido (JP). 川口 哲 (KAWAGUCHI, Satoshi) [JP/JP]; 〒062-0032 北海道 札幌市 豊平区西岡 2 条 1 1 丁目 1 1-1 3 Hokkaido (JP). 池田 英之 (IKEDA, Hideyuki) [JP/JP]; 〒001-0038 北海道 札幌市 北区北 3 8 条西

5 丁目 1-4 0-3 0 6 Hokkaido (JP). 和田 卓郎 (WADA, Takuro) [JP/JP]; 〒064-0920 北海道 札幌市 中央区南 2 0 条西 1 0 丁目 1-8 Hokkaido (JP). 山下 敏彦 (YAMASHITA, Toshihiko) [JP/JP]; 〒064-0811 北海道 札幌市 中央区南 1 1 条西 2 0 丁目 2-6 啓明 1 1 条シティハウス 1 0 0 1 号 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 五十部 穰 (ISOBE, Yutaka); 〒554-0022 大阪府 大阪市 此花区春日出中 3 丁目 1-9 8 住友製薬株式会社 知的財産部内 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: TUMOR ANTIGEN PROTEIN AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: 腫瘍抗原タンパク質及びその利用

(57) Abstract: It is intended to provide a CTL inducer containing as the active ingredient a protein having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2, a tumor antigen peptide originating in the above protein, etc.

(57) 要約: 配列番号: 2 に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を有効成分として含有してなる CTL の誘導剤、または前記タンパク質由来の腫瘍抗原ペプチド等を提供する。



WO 2004/029248 A1

明細書

腫瘍抗原タンパク質及びその利用

技術分野

- 5 本発明は、腫瘍抗原タンパク質に関する。さらに詳しくは、本発明は、腫瘍抗原タンパク質 P B F およびその遺伝子の、癌免疫分野における利用に関する。

背景技術

- 10 生体による腫瘍細胞やウイルス感染細胞等の排除には細胞性免疫、とりわけ細胞傷害性T細胞（CTLと称する）が重要な働きをしている。CTLは、腫瘍細胞上の抗原ペプチド（腫瘍抗原ペプチド）とMHC（Major Histocompatibility Complex）クラス I 抗原（ヒトの場合はHLA抗原と称する）との複合体を認識し、腫瘍細胞を攻撃・破壊する。

- 15 腫瘍抗原ペプチドは、腫瘍に特有のタンパク質、すなわち腫瘍抗原タンパク質が細胞内で合成された後、プロテアーゼにより細胞内で分解されることによって生成される。生成された腫瘍抗原ペプチドは、小胞体内でMHCクラス I 抗原（HLA抗原）と結合して複合体を形成し、細胞表面に運ばれて抗原提示される。この抗原提示された複合体を腫瘍特異的なCTLが認識し、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗腫瘍効果を示す。このような一連の作用の解明に伴い、腫瘍抗原
20 タンパク質または腫瘍抗原ペプチドをいわゆる癌免疫療法剤（癌ワクチン）として利用することにより、腫瘍患者の体内の腫瘍特異的CTLを増強させる治療法が可能となった。

- 25 腫瘍抗原タンパク質は、Immunity, vol.10:281, 1999 のtable1に記載のものが代表例として挙げられる。具体的にはメラノサイト組織特異的タンパク質である gp100（J. Exp. Med., 179:1005, 1994）、MART-1（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91:3515, 1994）、およびチロシナーゼ（J. Exp. Med., 178:489, 1993）などのメラノソーム抗原、メラノーマ以外の腫瘍抗原タンパク質としてはHER2/neu（J. Exp. Med., 181:2109, 1995）、CEA（J. Natl. Cancer. Inst., 87:982, 1995）、およびPSA（J. Natl. Cancer. Inst., 89:293, 1997）などの腫瘍抗原タンパ

ク質が挙げられる。しかしながら、骨肉腫等の肉腫を含む癌（腫瘍）に対して幅広く適用可能な腫瘍抗原タンパク質は、未だ見出されていない。

パピローマウイルスのE2結合部位を認識する因子として、パピローマウイルス結合因子(Papillomavirus binding factor : PBF、 GenBank データベース Accession No. AF263928)が同定されている (Virology 293, 103-117, 2002)。しかしながら、該PBFと腫瘍との関係は何も知られていない。

発明の開示

本発明の目的は、腫瘍抗原タンパク質 P B F およびその遺伝子の、癌免疫分野における利用などを提供することにある。

本発明者らは、骨肉腫患者由来の骨肉種細胞株 OS2000を樹立し、また該OS2000に対して細胞傷害活性を有するCTL株 TcOS2000c1-303を樹立した。

続いてアッセイ用細胞として、293-EBNA細胞にHLA-B5502遺伝子（HLA-B55の1種）を導入した293-EBNA-B55細胞、および293-EBNA細胞にHLA-A2402遺伝子（HLA-A24の1種）を導入した293-EBNA-A24細胞を作製した。これら293-EBNA-B55細胞または293-EBNA-A24細胞に対して、OS2000から調製したcDNAライブラリーのcDNAクローンプールをトランスフェクトし、そのトランスフェクタントにTcOS2000c1-303を作用させ、TcOS2000c1-303が反応したか否かを、TcOS2000c1-303が有する細胞傷害活性により遊離したLDH量を測定することにより検討した。膨大なスクリーニングを繰り返した結果、最終的に、GenBank Accession No. AF263928として登録されているパピローマウイルス結合因子(Papillomavirus binding factor : PBF)（配列番号：1及び2）が、CTL誘導活性を有する新規な腫瘍抗原タンパク質であることを見出した。当該PBFが腫瘍抗原タンパク質としての機能を有することは従来全く知られておらず、また予想もされていなかった新規な知見である。

さらに本発明者らは、PBFが、HLA抗原に結合する腫瘍抗原ペプチド領域を含んでいることを確認した。また当該PBFは、肉腫および腎癌において幅広く高発現していることも明らかにした。

本発明において見出された腫瘍抗原タンパク質PBF又はその腫瘍抗原ペプチド、若しくはそれらの遺伝子は、in vivoまたはin vitroにおいてCTLの誘導剤、すなわ

ち癌ワクチンとして用いることができ、骨肉腫や腎癌等の腫瘍に対して治療または改善効果を発揮する。また当該PBFは肉腫や腎癌等の腫瘍に対する腫瘍マーカーとして有用である。

本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

5 すなわち本発明は下記に掲げるものである。

項1. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を有効成分として含有してなるCTLの誘導剤、

項2. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質が、以下の(a)～(d)：

10 (a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含有するタンパク質、

(b) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含有するタンパク質であって、かつ当該タンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識される特徴を有するタンパク質、

15 (c) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含有するタンパク質であって、かつ当該タンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識される特徴を有するタンパク質、および

(d) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質であって、かつ当該タンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識される特徴を有するタンパク質、

20 のいずれかである、項1に記載のCTLの誘導剤、

項3. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質の部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識されるペプチド、

25

項4. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質が、以下の(a)～(d)：

(a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含有するタンパク質、

(b) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失

、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含有するタンパク質であって、かつ当該タンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識される特徴を有するタンパク質、

- 5 (c) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含有するタンパク質であって、かつ当該タンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識される特徴を有するタンパク質、および

- (d) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質であって、かつ当該タンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識される特徴を有するタンパク質、
10 のいずれかである、項3に記載のペプチド、

項5. HLA抗原がHLA-A24またはHLA-B55である、項3または4に記載のペプチド、

- 項6. 配列番号：6～配列番号：55のいずれかに記載のアミノ酸配列を含有する、項5に記載のペプチド、
15

- 項7. 配列番号：6～配列番号：45のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位のアミノ酸をチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファンに置換し、及び／又はC末端のアミノ酸をフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンに置換したアミノ酸配列を含有する、項5に記載のペプチド、
20

項8. 項3～7のいずれかに記載のペプチドを含有するエピトープペプチド、

項9. 項3～8のいずれかに記載のペプチドを有効成分として含有してなるCTLの誘導剤、

- 項10. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する核酸を含有してなる、CTLの誘導剤、
25

項11. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、以下の(a)～(g)：

(a) 配列番号：1に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチド、

(b) 配列番号：1に記載の塩基配列の第337位～第1878位を含有するポリヌクレオチド、

(c) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するポリヌクレオチド、

5 (d) 配列番号：3に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチド、

(e) 上記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、かつ当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を発現させた細胞がCTLに認識される特徴を有するポリヌクレオチド、

10 (f) 上記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドと70%以上の配列同一性を示す塩基配列を含有するポリヌクレオチドであって、かつ当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を発現させた細胞がCTLに認識される特徴を有するポリヌクレオチド、

15 (g) 上記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、かつ当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を発現させた細胞がCTLに認識される特徴を有するポリヌクレオチド、

のいずれかである、項10に記載のCTLの誘導剤、

20 項12. ポリヌクレオチドが配列番号：1、配列番号：1の第337位～第1878位、または配列番号：3に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチドである、項10または11に記載のCTLの誘導剤、

項13. 項3～8のいずれかに記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する核酸、

25 項14. 項13に記載の核酸を含有してなるCTLの誘導剤、

項15. 以下の(a)～(d)：

(a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、

(b) 上記(a)記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する核酸

、

(c) 項 3～8 のいずれかに記載のペプチド、および

(d) 上記 (c) 記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する核酸、
のいずれかと、抗原提示能を有する細胞とをイン・ビトロで接触させることを特徴
とする、抗原提示細胞の製造方法、

項 16. 項 15 記載の製造方法により製造される抗原提示細胞、

項 17. 以下の (a)～(d)：

(a) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配
列を含有するタンパク質、

(b) 上記 (a) 記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する核酸
、

(c) 項 3～8 のいずれかに記載のペプチド、および

(d) 上記 (c) 記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する核酸、
のいずれかと、末梢血リンパ球とをイン・ビトロで接触させることを特徴とする、

C T L の誘導方法、

項 18. 項 17 に記載の誘導方法により誘導される C T L、

項 19. 項 3～7 のいずれかに記載のペプチドに特異的に結合する抗体、

項 20. 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ
酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列において、
連続する少なくとも 15 塩基を含有するポリヌクレオチド及び／または該ポリヌク
レオチドに相補的なポリヌクレオチドからなる腫瘍マーカー、

項 21. 配列番号：1 または配列番号：3 に記載の塩基配列において、連続する
少なくとも 15 塩基を含有するポリヌクレオチド及び／または該ポリヌクレオチド
に相補的なポリヌクレオチドからなる、項 20 に記載の腫瘍マーカー、

項 22. 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ
酸配列を含有するタンパク質のアミノ酸配列において、連続する少なくとも 8 アミ
ノ酸を含有するポリペプチドからなる腫瘍マーカー、

項 23. 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において、連続する少なくとも 8 ア
ミノ酸を含有するポリペプチドからなる、項 22 に記載の腫瘍マーカー、

項 2 4. 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質に対する抗体、若しくは項 1 9 に記載の抗体からなる腫瘍マーカー、

項 2 5. 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に対する抗体からなる、項 2 4 に記載の腫瘍マーカー、

項 2 6. 項 3 ～ 7 のいずれかに記載のペプチドと H L A 抗原とを含有する H L A テトラマー、

項 2 7. 項 2 6 に記載の H L A テトラマーからなる腫瘍マーカー、

項 2 8. 腫瘍が肉腫または腎癌である、項 2 0 ～ 2 5 および項 2 7 のいずれかに記載の腫瘍マーカー、

項 2 9. 項 2 0 ～ 2 5、項 2 7 および項 2 8 のいずれかに記載の腫瘍マーカーを含有してなる腫瘍の診断薬、

項 3 0. 癌ワクチンとして使用される、項 1、2、9、1 0、1 1、1 2 または 1 4 に記載の C T L の誘導剤。

図面の簡単な説明

図 1 は、1B9. 1H4 の cDNA を、293-EBNA-B55 または 293-EBNA-A24 に導入して発現させた時の CTL (TcOS2000c1-303) の反応性を、LDH リリースアッセイにより測定した結果を示したグラフである。図中、横軸は 490nm の吸光度を示す。

図 2 は、1B9. 1H4 の cDNA を、293-EBNA-B55 または 293-EBNA-A24 に導入して発現させた時の TcOS2000c1-303 の反応性を ^{51}Cr リリースアッセイにより測定した結果を示したグラフである。(A) は 293-EBNA-A24 細胞を用いた時の結果を、また (B) は 293-EBNA-B55 細胞を用いた時の結果を示す。図中、横軸は E/T 比を、また縦軸は細胞傷害性活性を示す。

図 3 は、1B9. 1H4 または PBF 遺伝子を、293-EBNA-A24 に導入して発現させた時の CTL (TcOS2000c1-303) の反応性を、LDH リリースアッセイにより測定した結果を示したグラフである。図中、横軸は 490nm の吸光度を示す。

図 4 は、1B9. 1H4 または PBF 遺伝子を、293-EBNA-B55 に導入して発現させた時の CTL (TcOS2000c1-303) の反応性を、LDH リリースアッセイにより測定した結果を示し

たグラフである。図中、横軸は490nmの吸光度を示す。

図5は、配列番号：46に記載のペプチドをパルスした293-EBNA-B55に対するCTL (TcOS2000c1-303) の反応性を、LDHリリースアッセイにより測定した結果を示したグラフである。図中、横軸は490nmの吸光度を示す。

5 図6は、腫瘍抗原タンパク質PBFをコードする遺伝子の各種細胞での発現を、RT-PCRにより解析した結果を示す写真である。図中、OS2000は骨肉種細胞株を、PBLは正常末梢血リンパ球を、EB-BはEBVトランスフォームB細胞を、K562は慢性骨髄性白血病細胞株を、293EBNAはアデノウイルスでトランスフォームしたヒト腎細胞株を指す。図中、SaOS、HOS、KIKU、Huo9およびNYは骨肉腫細胞株を指す。図中、HS-SY
10 II、SW982およびFujiは滑膜肉腫細胞株を指す。図中、HT1080は線維肉腫細胞株を指す。図中、HS729T、A204およびRDは横紋筋肉腫細胞株を指す。また図中、A673、W-ES、NCR-EW2、SCCH196、SK-ES1およびRD-ES1はユーイング肉腫細胞株を指す。PBF遺伝子の発現結果を上段に、また陽性コントロールであるG3PDH遺伝子の発現結果を下段に、それぞれ示す。

15

発明を実施するための最良の形態

1) 本発明のタンパク質

本発明のCTLの誘導剤に含有されるタンパク質（以下、本発明のタンパク質と称する場合がある）は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に
20 同一のアミノ酸配列を含有する。本発明のタンパク質は、天然物（例えば骨肉種細胞株）に由来するタンパク質であってもよく、また組換えタンパク質であっても良い。

ここで配列番号：2に記載のアミノ酸配列は、GenBank データベースにおいて Accession No. AF263928として登録されており、またVirology 293, 103-117 (2002)
25 に開示されたヒトパピローマウイルス結合因子 (Papillomavirus binding factor : PBF) のアミノ配列である。

前記において「配列番号：2に記載のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含有するタンパク質）」とは、具体的には、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または

配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含有し、そのN末端側及び/又はC末端側に他のアミノ酸配列の付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質などが挙げられる。

5 また前記において「配列番号：2に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質」とは、具体的には以下の(a)～(c)に挙げるタンパク質が挙げられる：

(a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び/又は付加されたアミノ酸配列を含有するタンパク質であって、かつ当該タンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識される特徴を有するタンパク質、
10 、

(b) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含有するタンパク質であって、かつ当該タンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識される特徴を有するタンパク質、

(c) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質であって、かつ当該タンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識される特徴を有するタンパク質。
15

好ましくは、配列番号：2に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。当該配列番号：2に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質としては、以下の(a')～(c')に挙げるタンパク質が挙げられる：

(a') 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び/又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、かつ当該タンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識される特徴を有するタンパク質、
25 、

(b') 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列からなるタンパク質であって、かつ当該タンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識される特徴を有するタンパク質、

(c') 配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの相補鎖

に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質であって、かつ当該タンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識される特徴を有するタンパク質。

前記(a)における「配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含有するタンパク質」とは、人為的に作製したいわゆる改変タンパク質や、生体内に存在するアレル変異体等のタンパク質を意味する。

ここでタンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、本発明タンパク質の活性が保持される限り制限はない。このように活性を喪失することなくアミノ酸残基が、どのように、何個欠失、置換及び／又は付加されればよいかを決定する指標は、当業者に周知のコンピュータプログラム、例えばDNA Star softwareを用いて見出すことができる。例えば変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内である。また置換されるアミノ酸は、タンパク質の構造保持の観点から、残基の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性並びに両親媒性など、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe及びTrpは互いに非極性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn及びGlnは互いに非荷電性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、Asp及びGluは互いに酸性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、またLys、Arg及びHisは互いに塩基性アミノ酸に分類されるアミノ酸である。ゆえに、これらを指標として同群に属するアミノ酸を適宜選択することができる。

前記(b)における「配列番号：2に記載のアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含有するタンパク質」とは、例えば配列番号：2に記載のアミノ酸配列と約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含有するタンパク質が挙げられる。具体的には、配列番号：2に記載のアミノ酸配列の部分配列からなるタンパク質などが挙げられる。

ここで「配列同一性」とは、2つのタンパク質間の、配列の同一性及び相同性をいう。当該「配列同一性」は、比較対象の配列の領域にわたって、最適な状態にア

ラインメントされた2つの配列を比較することにより決定される。ここで、比較対象のタンパク質は、2つの配列の最適なアラインメントにおいて、付加又は欠失（例えばギャップ等）を有していてもよい。このような配列同一性に関しては、例えば、Vector NTIを用いて、ClustalWアルゴリズム (Nucleic Acid Res., 22(22):467
5 3-4680 (1994)) を利用してアラインメントを作成することにより算出することができる。尚、配列同一性は、配列解析ソフト、具体的にはVector NTI、GENETYX-MACや公共のデータベースで提供される解析ツールを用いて測定される。前記公共データベースは、例えば、ホームページアドレス <http://www.ddbj.nig.ac.jp> において、一般的に利用可能である。

10 前記(c)における「配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、例えば配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドと約40%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上
15 の配列同一性を有する塩基配列を含有するポリヌクレオチドが挙げられる。具体的には、配列番号：1、配列番号：1の第337位～第1878位、または配列番号：3に記載の塩基配列と、約40%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の配列同一性を有する塩基配列を含有するポリヌクレオチドが挙げられる。より
20 より具体的には、配列番号：1、配列番号：1の第337位～第1878位、または配列番号：3に記載の塩基配列の部分配列からなる核酸などが挙げられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば Molecular Cloning 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書に記載の方法に従って行うことができる。また市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。
25

ここで「ストリンジェントな条件」とは、Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA)や前記Molecular Cloning 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に教示されるように、複合体或いはプローブを結合する核酸の

融解温度 (T_m) に基づいて決定することができる。

ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、 $6\times\text{SSC}$ ($20\times\text{SSC}$ は、 333mM Sodium citrate、 333mM NaCl を示す)、 0.5% SDS および 50% ホルムアミドを含む溶液中で 42°C にてハイブリダイズさせる条件、または $6\times\text{SSC}$ を含む (50% ホルムアミドは含まない) 溶液中で 65°C にてハイブリダイズさせる条件などが挙げられる。

またハイブリダイゼーション後の洗浄の条件としては、「 $1\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS、 37°C 」程度の条件を挙げるることができる。相補鎖はかかる条件で洗浄しても対象とする正鎖とハイブリダイズ状態を維持するものであることが好ましい。特に制限されないが、より厳しいハイブリダイズ条件として「 $0.5\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS、 42°C 」程度、さらに厳しいハイブリダイズ条件として「 $0.1\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS、 65°C 」程度の洗浄条件を挙げるることができる。

本発明のタンパク質は、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と実質的に同質の活性を有する。ここで実質的に同質の活性とは、本発明のタンパク質を発現させた細胞が CTL により認識される、すなわち当該細胞が CTL に反応性を示す、換言すれば本発明のタンパク質若しくは該タンパク質に由来する抗原ペプチドが CTL を活性化する若しくは CTL を誘導するという性質を示す。

前記において細胞とは、HLA 抗原を発現する細胞であることが好ましい。従って前記実質的に同質の活性とは、より具体的には、例えば HLA-A24 や HLA-B55 等の HLA 抗原を発現する細胞において本発明のタンパク質を発現させることにより、本発明タンパク質由来の抗原ペプチドと HLA 抗原との複合体が細胞表面に提示され、その結果、当該細胞が CTL に認識される、すなわち CTL が活性化される (CTL が誘導される) という性質を指す。

このような本発明タンパク質の性質は、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法 (例えば ^{51}Cr リリースアッセイ (J. Immunol., 159:4753, 1997)、LDH リリースアッセイ (LDH Cytotoxicity Detection Kit (タカラバイオ)、サイトカイン量の測定等) により容易に測定することができる。以下に具体的なアッセイ法を例示する。

まず、293-EBNA 細胞 (Invitrogen 社) 等の宿主細胞に対し、本発明タンパク質をコードする DNA を含有する発現ベクターと、HLA 抗原をコードする DNA を含有する発

現ベクターとをトランスフェクトする。ここで用いるHLA抗原をコードするDNAとしては、例えばHLA-A24抗原をコードするDNA若しくはHLA-B55抗原をコードするDNAが挙げられる。HLA-A24抗原をコードするDNAとしてはHLA-A2402のcDNA (Cancer Res., 55: 4248-4252 (1995)、Genbank Accession No. M64740) が挙げられる。またHLA-B55抗原をコードするDNAとしてはHLA-B5502のcDNA (GenBank Acc. No. M77777、J. Immunol., 148(4), 1155-1162(1992)) が挙げられる。

前記トランスフェクトは、例えばリポフェクトアミン試薬 (GIBCO BRL社製) を用いたリポフェクチン法などにより行うことができる。その後、用いたHLA抗原に拘束性のCTLを加えて作用させ、該CTLが反応 (活性化) して産生する種々のサイトカイン、例えばIFN- γ の量を、例えばELISA法などで測定することにより調べることができる。ここでCTLとしては、ヒトの末梢血リンパ球を配列番号: 2に記載の本発明タンパク質で刺激することにより調製されたCTLや、Int. J. Cancer, 39, 390-396, 1987, N. Eng. J. Med, 333, 1038-1044, 1995等に記載の方法により樹立したCTLを用いることができる。

また本発明のタンパク質は、例えばヒトモデル動物を用いたアッセイ (WO 02/47474 号公報、Int J. Cancer:100, 565-570 (2002)) に供することにより、in vivoでのCTL誘導活性を調べることができる。

本発明のタンパク質は、天然物 (例えば骨肉種細胞株、腎癌細胞株など) から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、また後述する本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する核酸を含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。

2) 本発明のペプチド

本発明のCTLの誘導剤に含有されるペプチド (以下、本発明のペプチドと称する場合がある) とは、前記本発明のタンパク質の部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識される腫瘍抗原ペプチドである。すなわち、前記した本発明のタンパク質のアミノ酸配列の一部よりなるペプチドであって、かつ、該ペプチドとHLA抗原との結合複合体がCTLにより認識されるようなペプチドであれば、本発明のタンパク質のアミノ酸配列中の如何なる位置に存する如何なる長さのペプチドであっても良い。

このような本発明のペプチドは、本発明のタンパク質の一部よりなる候補ペプチドを合成し、該候補ペプチドとHLA抗原との複合体がCTLにより認識されるか否か、すなわち候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するか否かをアッセイすることにより、同定することができる。

- 5 ここで、ペプチドの合成については、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて行うことができる。該公知方法としては文献（ペプタイド・シンセシス（Peptide Synthesis）, Interscience, New York, 1966；ザ・プロテインズ（The Proteins）, Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976；ペプチド合成, 丸善（株）, 1975；ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株）, 1985；医薬品の開発
10 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991）などに記載されている方法が挙げられる。

次に、本発明の腫瘍抗原ペプチドの同定方法につき、以下に記述する。

- HLA-A1, -A0201, -A0204, -A0205, -A0206, -A0207, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -Cw0401, -Cw0602などのHLAの型については、該HLAに結合して提示される抗原ペプチドの配列の規則性（モチーフ）が判明している（例えばImmunogenetics, 41:p178, 1995などを参照のこと）。例えばHLA-A24のモチーフとしては、8～11アミノ酸よりなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチ
15 オニンとなることが知られている（J. Immunol., 152, p3913, 1994、Immunogenetics, 41:p178, 1995、J. Immunol., 155:p4307, 1994）。またHLA-A2のモチーフについては、以下の表1に示したモチーフが知られている（Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155:p4749, 1995）。
- 20

表 1

| HLA-A2のタイプ | N末端から2番目のアミノ酸 | C末端のアミノ酸 |
|-------------|---------------|----------|
| HLA-A0201 | L, M | V, L |
| HLA-A0204 | L | L |
| 5 HLA-A0205 | V, L, I, M | L |
| HLA-A0206 | V, Q | V, L |
| HLA-A0207 | L | L |

(ペプチドの長さは8～11アミノ酸)

さらに近年、HLA抗原に結合可能と予想されるペプチド配列を、インターネット上、NIHのBIMASのソフトを使用することにより検索することができる (http://bimas.dcrf.nih.gov/molbio/hla_bind/)。

ペプチドの長さとしては、各種HLA分子に結合している抗原ペプチドの解析により (Immunogenetics, 41:178, 1995)、通常8から14アミノ酸程度であることが明らかにされている (ただしHLA-DR、-DP、-DQについては、14アミノ酸以上の長さの抗原ペプチドも認められる)。

これらのモチーフに関わるペプチド部分を本発明のタンパク質のアミノ酸配列中から選び出すのは容易である。例えば、前記BIMASソフトでの検索により、HLA抗原に結合可能と予想される配列を容易に選び出すことができる。選び出された候補ペプチドを前述の方法にて合成し、該候補ペプチドがHLA抗原と結合してCTLにより認識されるか否か、すなわち候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するか否かを測定することにより、本発明のペプチドを同定することができる。

本発明の腫瘍抗原ペプチドの具体的な同定法としては、例えば J. Immunol., 154, p2257, 1995に記載の方法が挙げられる。すなわち、候補ペプチドを提示すると考えられるタイプのHLA抗原が陽性のヒトから末梢血リンパ球を単離し、in vitroで該候補ペプチドを添加して刺激した場合に、該候補ペプチドをパルスしたHLA抗原陽性細胞を特異的に認識するCTLが誘導された場合は、該候補ペプチドが腫瘍抗原ペプチドに成り得ることが示される。ここでCTLの誘導の有無は、例えば、抗原ペプチド提示細胞に反応してCTLが産生する種々のサイトカイン (例えばIFN- γ) の

量を、例えばELISA法などによって測定することにより、調べることができる。また⁵¹Crで標識した抗原ペプチド提示細胞に対するCTLの傷害性を測定する方法（⁵¹Crリリースアッセイ、Int. J. Cancer, 58:p317, 1994）によっても調べることができる。

- 5 さらに、候補ペプチドを提示すると考えられるタイプのHLA抗原をコードするcDNAを発現する発現プラスミドを、例えば293-EBNA細胞（Invitrogen社）に導入した細胞に対して候補ペプチドをパルスし、この細胞に対して、前記候補ペプチドを提示すると考えられるタイプのHLA抗原に拘束性のCTLを反応させ、該CTLが産生する種々のサイトカイン（例えばIFN- γ ）の量を測定することによっても、
- 10 調べることができる（J. Exp. Med., 187: 277, 1998）。

- ここでHLA抗原としては、HLA-A24抗原若しくはHLA-B55抗原が挙げられる。HLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドを選択する場合には、前記HLA抗原をコードするcDNAとしてはHLA-A2402のcDNA（Cancer Res., 55: 4248-4252 (1995)、Genbank Accession No. M64740）を用いることができる。またHLA-B55拘束性の腫瘍抗原ペ
- 15 プチドを選択する場合は、前記HLA抗原をコードするcDNAとしてはHLA-B5502遺伝子（GenBank Acc.No. M77777、J. Immunol., 148(4), 1155-1162(1992)）を用いることができる。

- また前記CTLとしては、ヒトの末梢血リンパ球のペプチド刺激により調製される場合の他、Int. J. Cancer, 39, 390-396, 1987, N. Eng. J. Med, 333, 1038-104
- 20 4, 1995等に記載の方法により樹立したCTLを用いることができる。

また本発明のペプチドは、例えばヒトモデル動物を用いたアッセイ（WO 02/47474号公報、Int J. Cancer:100, 565-570 (2002)）に供することにより、in vivoでの活性を調べることができる。

- 前記のように腫瘍抗原ペプチドの配列の規則性（モチーフ）が判明している場合
- 25 と異なり、例えばHLA-B55のようにそのペプチドのモチーフが明らかでない場合は、該HLA-B55と腫瘍抗原ペプチドとの複合体を認識するCTL株が存在する場合には、例えばW097/46676や後述の実施例3に記載の方法に準じて本発明の腫瘍抗原ペプチドを同定することができる。

以上のような本発明のペプチドの具体例としては、配列番号：2に記載のアミノ

酸配列からなる本発明タンパク質の部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識されるペプチドが挙げられる。また、本発明のペプチドが結合するHLA抗原の観点からは、HLA-A24抗原またはHLA-B55抗原に結合する本発明のペプチドを挙げることができる。

- 5 より具体的には、例えばHLA-A24結合性の腫瘍抗原ペプチドとしては、BIMASソフトを用いた検索により同定される、以下の表2（9アミノ酸）および表3（10アミノ酸）に記載のいずれかのアミノ酸配列からなるペプチド（配列番号：6～45のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるペプチド）であって、HLA-A24抗原に結合してCTLに認識されるペプチドが挙げられる。

10 表2

| 位置 | アミノ酸配列 | 配列番号 |
|---------|-------------------------------------|---------|
| 145-153 | Ala Tyr Arg Pro Val Ser Arg Asn Ile | 配列番号：6 |
| 320-328 | Asp Phe Tyr Tyr Thr Glu Val Gln Leu | 配列番号：7 |
| 254-262 | Gly Phe Glu Thr Asp Pro Asp Pro Phe | 配列番号：8 |
| 240-248 | Lys Tyr Leu Gly Asp Ala Phe Gly Ser | 配列番号：9 |
| 12-20 | Arg Ser Leu Leu Gly Ala Arg Val Leu | 配列番号：10 |
| 30-38 | Ala Ala Pro Pro Ser Glu Pro Leu Leu | 配列番号：11 |
| 424-432 | Ile Tyr Thr Ser Val Ser Trp Ala Ala | 配列番号：12 |
| 105-113 | Thr Val Trp Leu Leu Glu Gln Lys Leu | 配列番号：13 |
| 234-242 | His Pro Gln Ala Ser Pro Lys Tyr Leu | 配列番号：14 |
| 440-448 | Leu Ser Pro Val Arg Ser Arg Ser Leu | 配列番号：15 |
| 279-287 | Met Tyr Lys Cys Leu Trp Pro Asn Cys | 配列番号：16 |
| 283-291 | Leu Trp Pro Asn Cys Gly Lys Val Leu | 配列番号：17 |
| 54-62 | Cys Gln Glu Gln Pro Lys Glu Val Leu | 配列番号：18 |
| 432-440 | Ala Ala Pro Ser Ala Ala Cys Ser Leu | 配列番号：19 |
| 101-109 | Glu Gly Gln Val Thr Val Trp Leu Leu | 配列番号：20 |
| 169-177 | Met Ala Ala Met Val Leu Thr Ser Leu | 配列番号：21 |
| 129-137 | Gly Pro Cys Pro Gln Ala Pro Pro Leu | 配列番号：22 |
| 354-362 | Ala Pro Thr Pro Ser Met Thr Gly Leu | 配列番号：23 |
| 503-511 | Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln Arg Phe | 配列番号：24 |
| 29-37 | Ser Ala Ala Pro Pro Ser Glu Pro Leu | 配列番号：25 |

表 3

| 位置 | アミノ酸配列 | 配列番号 |
|---------|---|-----------|
| 84-93 | Trp Tyr Gly Gly Gln Glu Cys Thr Gly Leu | 配列番号 : 26 |
| 409-418 | Ala Tyr Gln Ala Leu Pro Ser Phe Gln Ile | 配列番号 : 27 |
| 254-263 | Gly Phe Glu Thr Asp Pro Asp Pro Phe Leu | 配列番号 : 28 |
| 118-127 | Arg Val Glu Glu Val Trp Leu Ala Glu Leu | 配列番号 : 29 |
| 415-424 | Ser Phe Gln Ile Pro Val Ser Pro His Ile | 配列番号 : 30 |
| 81-90 | Val Tyr Val Trp Tyr Gly Gly Gln Glu Cys | 配列番号 : 31 |
| 104-113 | Val Thr Val Trp Leu Leu Glu Gln Lys Leu | 配列番号 : 32 |
| 99-108 | Trp Met Glu Gly Gln Val Thr Val Trp Leu | 配列番号 : 33 |
| 503-512 | Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln Arg Phe Leu | 配列番号 : 34 |
| 362-371 | Leu Pro Leu Ser Ala Leu Pro Pro Pro Leu | 配列番号 : 35 |
| 295-304 | Val Gly Ile Lys Arg His Val Lys Ala Leu | 配列番号 : 36 |
| 274-283 | Asn Ser Val Lys Val Met Tyr Lys Cys Leu | 配列番号 : 37 |
| 128-137 | Gln Gly Pro Cys Pro Gln Ala Pro Pro Leu | 配列番号 : 38 |
| 404-413 | Ile Gln Ala Asp His Ala Tyr Gln Ala Leu | 配列番号 : 39 |
| 168-177 | Met Met Ala Ala Met Val Leu Thr Ser Leu | 配列番号 : 40 |
| 424-433 | Ile Tyr Thr Ser Val Ser Trp Ala Ala Ala | 配列番号 : 41 |
| 489-498 | Val Tyr Gly Ile Glu His Arg Asp Gln Trp | 配列番号 : 42 |
| 439-448 | Ser Leu Ser Pro Val Arg Ser Arg Ser Leu | 配列番号 : 43 |
| 431-440 | Ala Ala Ala Pro Ser Ala Ala Cys Ser Leu | 配列番号 : 44 |
| 455-464 | Gln Pro Ala Pro Ala Met Lys Ser His Leu | 配列番号 : 45 |

また、HLA-B55結合性の腫瘍抗原ペプチドとしては、Cys Thr Ala Cys Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln Arg (配列番号:46) のアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。さらに、前記ペプチドの9、10若しくは11アミノ酸部分からなるペプチド、すなわち、

Cys Thr Ala Cys Arg Trp Lys Lys Ala (配列番号 : 47) 、

Thr Ala Cys Arg Trp Lys Lys Ala Cys (配列番号：48)、
Ala Cys Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln (配列番号：49)、
Cys Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln Arg (配列番号：50)、
Cys Thr Ala Cys Arg Trp Lys Lys Ala Cys (配列番号：51)、
5 Thr Ala Cys Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln (配列番号：52)、
Ala Cys Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln Arg (配列番号：53)、
Cys Thr Ala Cys Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln (配列番号：54)、および
Thr Ala Cys Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln Arg (配列番号：55)、
のいずれかに記載のアミノ酸からなるペプチドであって、HLA-B55抗原に結合してC
10 TLに認識されるペプチドが挙げられる。

本発明においては、前記の如き配列番号：2に記載のアミノ酸配列の一部からなるペプチドのみならず、配列番号：2に記載のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する本発明タンパク質の一部からなるペプチドも、HLA抗原と結合してCTLにより認識されるという性質を有する限り、本発明のペプチドの範疇に含まれる。すなわち、配列番号：2に記載のアミノ酸配列の一部を改変（欠失、置換及び/又は付加）したタンパク質の一部からなる改変ペプチド（以下、当該改変に係るペプチドを「改変ペプチド」と称する場合がある）であっても、HLA抗原と結合してCTLにより認識されるという性質を有する限り、本発明のペプチドの範疇に含まれる。具体的には、本発明タンパク質のアミノ酸配列、より具体的には配列番号：2に記載のアミノ酸配列の一部からなる本発明のペプチドのアミノ酸配列に対して、1又はそれ以上のアミノ酸残基の改変を施した改変ペプチドであって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識されるという腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するものは、本発明のペプチドの範疇に含まれる。

ここで、アミノ酸残基の「改変」とは、アミノ酸残基の置換、欠失、及び/又は付加（ペプチドのN末端、C末端へのアミノ酸の付加も含む）を意味し、好ましくはアミノ酸残基の置換が挙げられる。アミノ酸残基の置換に係る改変の場合、置換されるアミノ酸残基の数および位置は、腫瘍抗原ペプチドとしての活性が維持される限り、任意であるが、前記したように通常、腫瘍抗原ペプチドの長さが8～14アミノ酸程度であることから、1個から数個の範囲が好ましい。

本発明の改変ペプチドの長さとしては、8～14アミノ酸程度が好ましい（ただしHLA-DR、-DP、-DQについては、14アミノ酸以上の長さの場合もある。）

先に記載したように、HLA-A1、-A0201、-A0204、-A0205、-A0206、-A0207、-A11、-A24、-A31、-A6801、-B7、-B8、-B2705、-B37、-Cw0401、-Cw0602などのHLAの型については、該HLAに結合して提示される抗原ペプチドの配列の規則性（モチーフ）が判明している。また前記したように、HLA抗原に結合可能と予想されるペプチド配列をインターネット上検索することができる（http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/）。従って、該モチーフ等に基づき、前記改変ペプチドを作製することが可能である。

例えばHLA-A24に結合して提示される抗原ペプチドのモチーフとしては、前記したように、8～11アミノ酸よりなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンであることが知られている（J. Immunol., 152:p3913, 1994、Immunogenetics, 41:p178, 1995、J. Immunol., 155:p4307, 1994）。またHLA-A2の場合は、前記の表1に記載のモチーフが知られている。またインターネット上でHLA抗原に結合可能と予想されるペプチド配列が示されており（http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/）、例えば前記モチーフ上とり得るアミノ酸に類似の性質を持つアミノ酸が許容される。従って、これらモチーフ上アミノ酸の置換が可能な位置（HLA-A24、HLA-A2においてはペプチドの第2位とC末端）にあるアミノ酸を他のアミノ酸（好ましくは前記インターネット上で結合可能と予想されているアミノ酸）に置換したアミノ酸配列を含むものであって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識されるという活性を持つ改変ペプチドを挙げることができる。

より好ましくは、該位置において、前記モチーフ上知られたアミノ酸残基のいずれかに置換したアミノ酸配列を含有するペプチドであって、かつ前記活性を有する改変ペプチドが挙げられる。すなわち配列番号：6～45に示されるようなHLA-A24結合性のペプチドの場合、その第2位のアミノ酸をチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファンに置換し、及び／又はC末端のアミノ酸をフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンに置換した

改変ペプチドであって、かつ前記活性を有する改変ペプチドが挙げられる。このうち第2位のアミノ酸をチロシンに置換したペプチドがより好ましい。

本発明のペプチドには、さらに、前記本発明のペプチドを含有するエピトープペプチドも含まれる。

- 5 近年、複数のCTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結したペプチド（エピトープペプチド）が、効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1998, 161: 3186-3194には、癌抗原タンパク質PSA由来のHLA-A2, -A3, -A11, B53拘束性CTLエピトープを連結した約30merのペプチドが、イン・ビボでそれぞれのCTLエピトープに特異的なCTLを誘導したことが記載されている。
- 10 またCTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結させたペプチド（エピトープペプチド）により、効率的にCTLが誘導されることも示されている。ここでヘルパーエピトープとはCD4陽性T細胞を活性化させる作用を有するペプチドを指すものであり（Immunity., 1:751, 1994）、例えばB型肝炎ウイルス由来のHBV c 1 2 8 - 1 4 0や破傷風毒素由来のTT 9 4 7 - 9 6 7などが知られている。当該ヘルパーエピトープにより活性化されたCD4陽性T細胞は、CTLの分化の誘導や維持、およびマクロファージなどのエフェクター活性化などの作用を発揮するため、抗腫瘍免疫応答に重要であると考えられている。このようなヘルパーエピトープとCTLエピトープとを連列したペプチドの具体例として、例えばJournal of Immunology 1999, 162: 3915-3925には、HBV由来HLA-A2拘束性抗原ペプチド6種類、HLA-A11拘束性抗原ペプチド3種類、およびヘルパーエピトープより構成されるペプチドをコードするDNA（ミニジーン）が、イン・ビボでそれぞれのエピトープに対するCTLを効果的に誘導したことが記載されている。また実際に、CTLエピトープ（メラノーマ抗原gp100の第280位～288位からなる癌抗原ペプチド）とヘルパーエピトープ（破傷風毒素由来Tヘルパーエピトープ）とを連結したペプチドが臨床試験に
- 15 供されている（Clinical Cancer Res., 2001, 7:3012-3024）。
- 20 従って、前記本発明のペプチドを含む複数のエピトープを連結したペプチド（エピトープペプチド）であって、CTL誘導活性を有するペプチドも、本発明のペプチドの具体例として例示することができる。
- 25 ここに、エピトープペプチドとは、①複数のCTLエピトープ（腫瘍抗原ペプチド

2 2

) を連結したペプチド、若しくは②CTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結したペプチドであって、抗原提示細胞内にてプロセッシングを受け、生じた腫瘍抗原ペプチドが抗原提示細胞に提示され、CTL誘導活性を導くペプチドとして定義される。

- 5 ここで、本発明のペプチドに連結させるエピトープがCTLエピトープの場合、用いるCTLエピトープとしては、配列番号：2に記載のアミノ酸配列由来のHLA-A1, -A0201, -A0204, -A0205, -A0206, -A0207, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -B55, -Cw0401, -Cw0602などに拘束性のCTLエピトープが挙げられる。また、他の腫瘍抗原タンパク質由来のCTLエピトープも挙げられる。これらCTL
- 10 エピトープは複数個連結することが可能であり、1つのCTLエピトープの長さとしては、各種HLA分子に結合している抗原ペプチドの解析により (Immunogenetics, 41:178, 1995)、8～14アミノ酸程度を挙げることができる。

- また本発明のペプチドに連結させるエピトープがヘルパーエピトープの場合、用いるヘルパーエピトープとしては、前述のようなB型肝炎ウイルス由来のHBV c
- 15 1 2 8 - 1 4 0や破傷風毒素由来のTT 9 4 7 - 9 6 7などが挙げられる。また当該ヘルパーエピトープの長さとしては、13～30アミノ酸程度、好ましくは13～17アミノ酸程度を挙げることができる。

- このような複数のエピトープを連結させたペプチド(エピトープペプチド)は、前述のように一般的なペプチド合成法によって製造することができる。またこれら
- 20 複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列情報に基づいて、通常のDNA合成および遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。すなわち、当該ポリヌクレオチドを周知の発現ベクターに挿入し、得られた組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換して作製された形質転換体を培養し、培養物より目的の複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドを回収
- 25 することにより製造することができる。これらの手法は、前述のように文献(Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory(1983)、DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS(1985))に記載の方法などに準じて行うことができる。

 以上のようにして製造された複数のエピトープを連結させたエピトープペプチドを、前述のin vitroアッセイや、WO 02/47474 号公報および Int J. Cancer:100,5

65-570 (2002)に記述のヒトモデル動物を用いたin vivoアッセイに供すること等によりCTL誘導活性を測定することができる。

さらに、前記本発明のペプチドのN末端アミノ酸のアミノ基、またはC末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾することも可能であり、このような修飾に係るペプチドも本発明のペプチドの範疇に含まれる。

ここでN末端アミノ酸のアミノ基の修飾基としては、例えば1～3個の炭素数1から6のアルキル基、フェニル基、シクロアルキル基、アシル基が挙げられ、アシル基の具体例としては炭素数1から6のアルカノイル基、フェニル基で置換された炭素数1から6のアルカノイル基、炭素数5から7のシクロアルキル基で置換されたカルボニル基、炭素数1から6のアルキルスルホニル基、フェニルスルホニル基、炭素数2から6のアルコキシカルボニル基、フェニル基で置換されたアルコキシカルボニル基、炭素数5から7のシクロアルコキシで置換されたカルボニル基、フェノキシカルボニル基等が挙げられる。

C末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾したペプチドとしては、例えばエステル体およびアミド体が挙げられ、エステル体の具体例としては、炭素数1から6のアルキルエステル、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキルエステル、炭素数5から7のシクロアルキルエステル等が挙げられ、アミド体の具体例としては、アミド、炭素数1から6のアルキル基の1つまたは2つで置換されたアミド、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキル基の1つまたは2つで置換されたアミド、アミド基の窒素原子を含んで5から7員環のアザシクロアルカンを形成するアミド等が挙げられる。

3) 本発明のポリヌクレオチド及びそれを含有する核酸

本発明のCTLの誘導剤に含有される核酸（以下、本発明の核酸と称する場合がある）は、前記本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチド（以下、本発明のポリヌクレオチドと称する場合がある）を含有する。

本発明のポリヌクレオチドは、種々の細胞や組織、例えば骨肉種や腎癌等に由来する細胞や組織のcDNAやmRNA、cRNA、ゲノムDNA、または合成DNAのいずれであっても良い。また1本鎖、2本鎖のいずれの形態であっても良い。具体的には、

(a) 配列番号：1に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチド、

(b) 配列番号：1 に記載の塩基配列の第337位～第1878位を含有するポリヌクレオチド、

(c) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するポリヌクレオチド、

- 5 (d) 配列番号：3 に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチド、
またはこれら (a) ～(d) のポリヌクレオチドと実質的に同一の塩基配列を含有するポリヌクレオチドが挙げられる。

ここで配列番号：1 に記載の塩基配列は、GenBank データベースにおいて Accession No. AF263928として登録されており、またVirology 293, 103-117 (2002) に開示されたヒトパピローマウイルス結合因子 (Papillomavirus binding factor : PBF、配列番号：2) をコードする塩基配列であり、その第337位～第1878位がオープンリーディングフレームに該当する。また配列番号：3 に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチドは、配列番号：1 に記載の塩基配列と同一の塩基配列部分を含有する類似のポリヌクレオチドである。具体的には、配列番号：3 に記載の塩基配列の第1位～第1469位の部分と、配列番号：1 に記載の塩基配列の第704位～1878位の部分とは、配列番号：3 にのみ存在する 294bpを除けば100%の配列同一性を有している。

前記において (a) 配列番号：1 に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチド、(b) 配列番号：1 に記載の塩基配列の第337位～第1878位を含有するポリヌクレオチド、(c) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するポリヌクレオチド、若しくは(d) 配列番号：3 に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチドとは、より具体的には、これら配列番号：1、配列番号：1の第337位～第1878位、若しくは配列番号：3のいずれかに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド、または配列番号：2 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドが例示される。さらに、これら配列番号：1、配列番号：1の第337位～第1878位、若しくは配列番号：3のいずれかに記載の塩基配列、または配列番号：2 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列の5'末端側及び/又は3'末端側に他の塩基配列の付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドが例示される。

当該ポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質

が、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と実質的に同質の活性を有する。ここで実質的に同質の活性とは、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識されるという性質を指す。当該活性およびその測定法については、前記「1)本発明のタンパク質」において記載したとおりである。

配列番号：1または配列番号：3に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチドは、GenBank Accession No. AF263928において開示されている塩基配列、あるいは本明細書の配列表の配列番号：1または3に開示されている塩基配列の適当な部分をハイブリダイゼーションのプロープあるいはPCRのプライマーに用いて、例えば骨肉腫細胞株（例えばSaOS-2）由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることなどによりクローニングすることができる。該クローニングは、例えばMolecular Cloning 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書に従い、当業者ならば容易に行うことができる。

また前記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドと実質的に同一の塩基配列を含有するポリヌクレオチドとは、具体的には、

(e) 前記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、かつ当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を発現させた細胞がCTLに認識される特徴を有するポリヌクレオチド、

(f) 上記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドと70%以上の配列同一性を示す塩基配列を含有するポリヌクレオチドであって、かつ当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を発現させた細胞がCTLに認識される特徴を有するポリヌクレオチド、

(g) 上記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、かつ当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を発現させた細胞がCTLに認識される特徴を有するポリヌクレオチド、
が挙げられる。

好ましくは、前記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドと実質的に同一の塩基配列からなるポリヌクレオチドが挙げられる。前記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドと実質的に同一の塩基配列からなるポリヌクレオチドとしては、以下の(e')～(g')に挙げるポリヌクレオチドが挙げられる：

- 5 (e') 前記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、かつ当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を発現させた細胞がCTLに認識される特徴を有するポリヌクレオチド、
- 10 (f') 上記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドと70%以上の配列同一性を示す塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、かつ当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を発現させた細胞がCTLに認識される特徴を有するポリヌクレオチド、
- 15 (g') 上記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、かつ当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を発現させた細胞がCTLに認識される特徴を有するポリヌクレオチド。

前記において「前記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、例えば前

20 記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドの塩基配列と約40%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の配列同一性を有する塩基配列を含有するポリヌクレオチドが挙げられる。具体的には、前記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドの部分配列からなるポリヌクレオチドなどが挙げられる。

25 ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば Molecular Cloning 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書に記載の方法に従って行うことができる。また市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

ここで「ストリンジエントな条件」とは、Berger and Kimmel (1987, Guide to

Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA)や前記Molecular Cloning 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に教示されるように、複合体或いはプローブを結合する核酸の融解温度(T_m)に基づいて決定することができる。

- 5 ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、 $6\times\text{SSC}$ ($20\times\text{SSC}$ は、 333mM Sodium citrate、 333mM NaClを示す)、 0.5% SDSおよび 50% ホルムアミドを含む溶液中で 42°C にてハイブリダイズさせる条件、または $6\times\text{SSC}$ を含む(50% ホルムアミドは含まない)溶液中で 65°C にてハイブリダイズさせる条件などが挙げられる。

- 10 またハイブリダイゼーション後の洗浄の条件としては、「 $1\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS、 37°C 」程度の条件を挙げることができる。相補鎖はかかる条件で洗浄しても対象とする正鎖とハイブリダイズ状態を維持するものであることが好ましい。特に制限されないが、より厳しいハイブリダイズ条件として「 $0.5\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS、 42°C 」程度、さらに厳しいハイブリダイズ条件として「 $0.1\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS、 65°C 」程度の洗浄条件を挙げることができる。

- 15 前記において「上記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドと 70% 以上の配列同一性を示す塩基配列を含有するポリヌクレオチド」とは、例えば前記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドの塩基配列と約 70% 以上、より好ましくは約 80% 以上、さらに好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の配列同一性を示す塩基配列を含有するポリヌクレオチドが挙げられる。具体的には、前記(a)～(d)の
20 いずれかのポリヌクレオチドの部分配列からなるポリヌクレオチドなどが挙げられる。

- ここで「配列同一性」とは、2つのポリヌクレオチド間の、配列の同一性及び相
同性をいう。当該「配列同一性」は、比較対象の配列の領域にわたって、最適な状
態にアラインメントされた2つの配列を比較することにより決定される。ここで、
25 比較対象のポリヌクレオチドは、2つの配列の最適なアラインメントにおいて、付
加又は欠失(例えばギャップ等)を有していてもよい。このような配列同一性に関
しては、例えば、Vector NTIを用いて、ClustalWアルゴリズム(Nucleic Acid Res.
, 22(22):4673-4680(1994))を利用してアラインメントを作成することにより算出
することができる。尚、配列同一性は、配列解析ソフト、具体的にはVector NTI、GE

NETYX-MACや公共のデータベースで提供される解析ツールを用いて測定される。前記公共データベースは、例えば、ホームページアドレス<http://www.ddbj.nig.ac.jp>において、一般的に利用可能である。

このような配列同一性を有するポリヌクレオチドは、前述のハイブリダイゼーション反応や通常のPCR反応により、または後述するポリヌクレオチドの改変（欠失、付加、置換）反応により作製することができる。

前記において「上記(a)～(d)のいずれかのポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含有するタンパク質」とは、人為的に作製したいわゆる改変タンパク質や、生体内に存在するアレル変異体等のタンパク質をコードする核酸を意味する。

ここでタンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、本発明タンパク質の活性が保持される限り制限はない。このように活性を喪失することなくアミノ酸残基が、どのように、何個欠失、置換及び／又は付加されればよいかを決定する指標は、当業者に周知のコンピュータプログラム、例えばDNA Star softwareを用いて見出すことができる。例えば変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内である。また置換されるアミノ酸は、タンパク質の構造保持の観点から、残基の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性並びに両親媒性など、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe及びTrpは互いに非極性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn及びGlnは互いに非荷電性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、Asp及びGluは互いに酸性アミノ酸に分類されるアミノ酸であり、またLys、Arg及びHisは互いに塩基性アミノ酸に分類されるアミノ酸である。ゆえに、これらを指標として同群に属するアミノ酸を適宜選択することができる。

この改変タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、例えば、Molecular Cloning 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書に記載の種々の方法、例えば部位特異的変異誘発やPCR法等によって製造することができる。また市販のキットを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの公知の方法に従

って製造することもできる。

以上のような本発明のポリヌクレオチドは、当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質が、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質である。ここで実質的に同質の活性とは、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質を発現させた細胞がCTLにより認識されるという性質を指す。当該活性およびその測定法については、前記「1)本発明のタンパク質」において記載したとおりである。

本発明のポリヌクレオチドを含有する核酸は、1本鎖および2本鎖のいずれの形態もとることができる。本発明のポリヌクレオチドが2本鎖の場合、前記本発明のポリヌクレオチドを発現ベクターに挿入することにより、本発明のタンパク質を発現するための組換え発現ベクターを作製することができる。すなわち本発明の核酸の範疇には、本発明の2本鎖型ポリヌクレオチドを発現ベクターに挿入して作製された組換え発現ベクターも含まれる。

ここで用いる発現ベクターとしては、用いる宿主や目的等に応じて適宜選択することができ、プラスミド、ファージベクター、ウイルスベクター等が挙げられる。

例えば、宿主が大腸菌の場合、ベクターとしては、pUC118、pUC119、pBR322、pC R3等のプラスミドベクター、 λ ZAPII、 λ gt11などのファージベクターが挙げられる。宿主が酵母の場合、ベクターとしては、pYES2、pYEUra3などが挙げられる。宿主が昆虫細胞の場合には、pAcSGHisNT-Aなどが挙げられる。宿主が動物細胞の場合には、pCEP4、pKCR、pCDM8、pGL2、pcDNA3.1、pRc/RSV、pRc/CMVなどのプラスミドベクターや、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクターなどのウイルスベクターが挙げられる。

前記ベクターは、発現誘導可能なプロモーター、シグナル配列をコードする遺伝子、選択用マーカー遺伝子、ターミネーターなどの因子を適宜有していても良い。

また、単離精製が容易になるように、チオレドキシン、Hisタグ、あるいはGST（グルタチオンS-トランスフェラーゼ）等との融合タンパク質として発現する配列が付加されていても良い。この場合、宿主細胞内で機能する適切なプロモーター（lac、tac、trc、trp、CMV、SV40初期プロモーターなど）を有するGST融合タンパクベクター（pGEX4Tなど）や、Myc、Hisなどのタグ配列を有するベクター（pcDNA3.1/M

yc-Hisなど)、さらにはチオレドキシンおよびHisタグとの融合タンパク質を発現するベクター (pET32a) などを用いることができる。

前記で作製された発現ベクターで宿主を形質転換することにより、当該発現ベクターを含有する形質転換細胞を作製することができる。

- 5 ここで用いられる宿主としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。大腸菌としては、E. coli K-12系統のHB101株、C600株、JM109株、DH5 α 株、AD494(DE3)株などが挙げられる。また酵母としては、サッカロミセス・セルビジエなどが挙げられる。動物細胞としては、L929細胞、BALB/c3T3細胞、C127細胞、CHO細胞、COS細胞、Vero細胞、Hela細胞、293-EBNA細胞などが挙げられる。昆虫細胞としてはsf9などが挙げられる。

- 10 宿主細胞への発現ベクターの導入方法としては、前記宿主細胞に適合した通常の導入方法を用いれば良い。具体的にはリン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、遺伝子導入用リピッド (Lipofectamine、Lipofectin; Gibco-BRL社) を用いる方法などが挙げられる。導入後、選択マーカを含む通常
15 の培地にて培養することにより、前記発現ベクターが宿主細胞中に導入された形質転換細胞を選択することができる。

- 20 以上のようにして得られた形質転換細胞を好適な条件下で培養し続けることにより、本発明のタンパク質を製造することができる。得られたタンパク質は、一般的な生化学的精製手段により、さらに単離・精製することができる。ここで精製手段としては、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等が挙げられる。また本発明のタンパク質を、前述のチオレドキシンやHisタグ、GST等との融合タンパク質として発現させた場合は、これら融合タンパク質やタグの性質を利用した精製法により単離・精製することができる。

- 25 本発明の核酸の範疇には、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する核酸も含まれる。

本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドは、DNAの形態であってもRNAの形態であっても良い。これら本発明のポリヌクレオチドは、本発明のペプチドのアミノ酸配列情報およびそれによりコードされるDNAの配列情報に基づき容易に製造

することができる。具体的には、通常のDNA合成やPCRによる増幅などによって、製造することができる。

本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドは、具体的には、前記エピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

5 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する核酸は、1本鎖および2本鎖のいずれの形態もとることができる。本発明のポリヌクレオチドが2本鎖の場合、前記本発明のポリヌクレオチドを発現ベクターに挿入することにより、本発明のペプチド（エピトープペプチド）を発現するための組換え発現ベクターを作製することができる。

10 ここで用いる発現ベクターや宿主細胞、宿主細胞の形質転換方法等については、前述の記載と同様である。

4) 本発明のタンパク質を有効成分とするCTLの誘導剤

15 本発明のタンパク質を含有する細胞はCTLに認識されるという特徴を有する。すなわち本発明のタンパク質はCTLの誘導剤である。誘導されたCTLは、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗腫瘍作用を発揮することができる。従って本発明のタンパク質は、腫瘍の治療または予防のための医薬（癌ワクチン）の有効成分とすることができる。本発明のタンパク質を有効成分として含有するCTLの誘導剤は、本発明のタンパク質を腫瘍患者に投与することで、腫瘍を治療または予防し得るものである。当該タンパク質を腫瘍患者に投与すると、抗原提示細胞内に取り込まれ、その後、細胞内分解を受けて生じた腫瘍抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に提示され、この複合体に特異的なCTLが体内で効率的に増殖し、腫瘍細胞を破壊する。以上のようにして、腫瘍の治療又は予防が達成される。

25 本発明のタンパク質を有効成分とするCTLの誘導剤は、配列番号：2に記載のPBF陽性の如何なる腫瘍患者に対しても使用することができる。具体的には、例えば骨肉腫などの肉腫全般、又は腎癌などの癌（腫瘍）の予防または治療のために使用することができる。

 本発明のタンパク質を有効成分として含有するCTLの誘導剤は、細胞性免疫が効果的に成立するように、医薬として許容されるキャリアー、例えば適当なアジュバ

ントと混合して投与、又は併用して投与することができる。

アジュバントとしては、文献 (Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994) に記載のものなどが応用可能であり、具体的には、菌体由来成分又はその誘導体、サイトカイン、植物由来成分又はその誘導体、海洋生物由来成分又はその誘導体、水酸化アルミニウムの如き鉱物ゲル、リソレシチン、プルロニックポリオールの如き界面活性剤、ポリアニオン、ペプチド、または油乳濁液 (エマルション製剤) などを挙

5 げることができる。また、リポソーム製剤、直径数 μm のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤、マイクロスフェア製剤、マイクロカプセル製剤なども考えられる。

10 前記において菌体由来成分又はその誘導体とは、具体的には、例えば①細菌の死菌、②細菌由来の細胞壁骨格 (Cell Wall Skeleton, CWSと略する)、③菌体由来の特定の成分又はその誘導体等に分類される。ここで①細菌の死菌としては、例えば溶連菌粉末 (例えばピシバニール; 中外製薬株式会社)、死菌浮遊物カクテル (例えばブロンカスマ・ベルナ; 三和化学研究所)、あるいはヒト型結核菌の死菌等

15 が挙げられる。

②細菌由来のCWSとしては、マイクバクテリア属由来のCWS (例えばマイコバクテリア属ウシ型結核菌であるBCG株のCWS)、ノカルディア属由来のCWS (例えばノカルディア・ノブラのCWS)、あるいはコリネバクテリア属由来のCWS等が挙げられる。

20 ③菌体由来の特定の成分又はその誘導体としては、例えば菌体由来多糖類であるヒト型結核菌由来多糖類成分 (例えばアンサー; ゼリア新薬工業株式会社) や担子菌由来多糖類 (例えばレンチナン; 味の素、クレスチン; 三共株式会社、担子菌カワラタケ)、またムラミルジペプチド (MDP) 関連化合物、リポ多糖 (LPS)、リピドA関連化合物 (MPL)、糖脂質トレハロースジマイコレート (TDM)

25 、細菌由来のDNA (例えばCpGオリゴヌクレオチド)、あるいはこれらの誘導体などが挙げられる。

これら菌体由来成分及びその誘導体は、既に市販されているものであればそれ入手するか、又は公知文献 (例えばCancer Res., 33, 2187-2195(1973)、J. Natl. Cancer Inst., 48, 831-835(1972)、J. Bacteriol., 94, 1736-1745(1967)、Gann, 69, 619-6

26(1978)、J. Bacteriol., 92, 869-879(1966)、J. Natl. Cancer Inst., 52, 95-101(1974)) 等に基き単離又は製造することが可能である。

前記において「サイトカイン」とは、例えばIFN- α 、IL-12、GM-CSF、IL-2、IFN- γ 、IL-18、あるいはIL-15などが挙げられる。これらのサイトカインは、天然品
5 であっても遺伝子組換え品であっても良い。これらのサイトカインは、既に市販されていればそれを入手して使用することができる。また遺伝子組換え品であれば、例えばGenBank、EMBL、あるいはDDBJ等のデータベースにおいて登録されている各塩基配列に基き、常法により所望の遺伝子をクローニングし、適当な発現ベクターに連結して作製された組換え発現ベクターで宿主細胞を形質転換することにより、
10 発現・生産することができる。

前記において「植物由来成分又はその誘導体」とは、例えばサポニン由来成分であるQuil A (Accurate Chemical&Scientific Corp)、QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals inc.)、あるいはグリチルリチン (SIGMA-ALDRICHなど) などが挙げられる。

15 前記において「海洋生物由来成分又はその誘導体」とは、例えば海綿由来の糖脂質である α -ガラクトシルセラミドなどが挙げられる。

前記において油乳濁液 (エマルション製剤) とは、例えば油中水型 (w/o) エマルション製剤、水中油型 (o/w) エマルション製剤、水中油中水型 (w/o/w) エマルション製剤などが挙げられる。

20 ここで油中水型 (w/o) エマルション製剤は、有効成分を水の分散相に分散させた形態をとる。水中油型 (o/w) エマルション製剤は、有効成分を水の分散媒に分散させた形態をとる。また水中油中水型 (w/o/w) エマルション製剤は、有効成分を最内相の水の分散相に分散させた形態をとる。このようなエマルション製剤の調製は、例えば、特開平8-985号公報、特開平9-122476号公報
25 等を参考にして行うことができる。

前記においてリポソーム製剤とは、有効成分を脂質二重膜構造のリポソームで水相内または膜内に包み込んだ形の微粒子である。リポソームを作るための主要な脂質としては、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン等が挙げられ、これにジセチルホスフェート、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン等を加えてリポソ

ームに荷電を与えて安定化させる。リポソームの調製方法としては、超音波法、エタノール注入法、エーテル注入法、逆相蒸発法、フレンチプレスエクストラクション法等が挙げられる。

前記においてマイクロスフェア製剤は、均質な高分子マトリックスから構成され、該マトリックス中に有効成分が分散された形の微粒子である。マトリックスの材料としては、アルブミン、ゼラチン、キチン、キトサン、デンプン、ポリ乳酸、ポリアルキルシアノアクリレート等の生分解性高分子が挙げられる。マイクロスフェア製剤の調製方法としては公知の方法 (Eur. J. Pharm. Biopharm. 50:129-146, 2000、Dev. Biol. Stand. 92:63-78, 1998、Pharm. Biotechnol. 10:1-43, 1997) 等に従えばよく特に限定されない。

前記においてマイクロカプセル製剤は、有効成分を芯物質として被膜物質で覆った形の微粒子である。被膜物質に用いられるコーティング材料としては、カルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートフタレート、エチルセルロース、ゼラチン、ゼラチン・アラビアゴム、ニトロセルロース、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース等の膜形成性高分子が挙げられる。マイクロカプセル製剤の調製方法は、コアセルベーション法、界面重合法等が挙げられる。

投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与などが挙げられる。製剤中の本発明のタンパク質の投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg~1000mg、好ましくは0.001mg~100mg、より好ましくは0.01mg~10mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

5) 本発明のペプチドを有効成分とするCTLの誘導剤

本発明のペプチドはCTL誘導活性を有するCTLの誘導剤である。誘導されたCTLは、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗腫瘍作用を発揮することができる。従って本発明のペプチドは、腫瘍の治療または予防のための医薬の有効成分とすることができる。本発明のペプチドを有効成分として含有するCTLの誘導剤を腫瘍患者に投与すると、抗原提示細胞のHLA抗原に本発明のペプチドが提示され、提示されたHLA抗原とペプチドとの結合複合体特異的CTLが増殖して腫瘍細胞を破壊することができ、従って、患者の腫瘍を治療又は予防することができる。

本発明のペプチドを有効成分とするCTLの誘導剤は、配列番号：2に記載のPBFタンパク陽性の如何なる腫瘍患者に対しても使用することができる。具体的には、例えば骨肉腫などの肉腫全般または腎癌などの癌（腫瘍）の予防または治療のために使用することができる。

- 5 本発明のペプチドを有効成分とするCTLの誘導剤は、単一のCTLエピトープ（本発明のペプチド）を有効成分とするものであっても、また他のペプチド（CTLエピトープやヘルパーエピトープ）と連結したエピトープペプチドを有効成分とするものであっても良い。近年、複数のCTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結したエピトープペプチドが、イン・ビボで効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。
- 10 。例えばJournal of Immunology 1998, 161: 3186-3194には、癌抗原タンパク質PS A由来のHLA-A2, -A3, -A11, B53拘束性CTLエピトープ（抗原ペプチド）を連結した約30merのエピトープペプチドが、イン・ビボでそれぞれのCTLエピトープに特異的なCTLを誘導したことが記載されている。またCTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結させたエピトープペプチドにより、効率的にCTLが誘導されることも示されている。
- 15 このようなエピトープペプチドの形態で投与した場合、抗原提示細胞内に取り込まれ、その後、細胞内分解を受けて生じた個々の抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示され、この複合体に特異的なCTLが体内で効率的に増殖し、腫瘍細胞を破壊する。このようにして腫瘍の治療または予防が達成される。

- 20 本発明のペプチドを有効成分とするCTLの誘導剤は、細胞性免疫が効果的に成立するように、医薬として許容されるキャリアー、例えば適当なアジュバントと混合して投与、又は併用して投与することができる。

- アジュバントとしては、文献（Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994）に記載のものなどが応用可能であり、具体的には、菌体由来成分又はその誘導體、サイト
- 25 カイン、植物由来成分又はその誘導體、海洋生物由来成分又はその誘導體、水酸化アルミニウムの如き鉱物ゲル、リソレシチン、プルロニックポリオールの如き界面活性剤、ポリアニオン、ペプチド、または油乳濁液（エマルション製剤）などを挙げることができる。また、リポソーム製剤、直径数 μm のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤、マイクロスフェア製剤、マイクロカプセ

ル製剤なども考えられる。これらアジュバントの具体例については、前記「4) 本発明のタンパク質を有効成分とするCTLの誘導剤」の項を参照されたい。

投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与などが挙げられる。製剤中の本発明のペプチドの投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg～1000mg、好ましくは0.001mg～1000mg、より好ましくは0.1mg～10mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

6) 本発明の核酸を有効成分とするCTLの誘導剤

本発明の核酸を発現させた細胞は、CTLに認識されるという特徴を有する。すなわち本発明の核酸はCTLの誘導剤である。誘導されたCTLは、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗腫瘍作用を発揮することができる。従って本発明の核酸は、腫瘍の治療または予防のための医薬の有効成分とすることができる。本発明の核酸を有効成分として含有するCTLの誘導剤は、例えば、本発明の核酸を腫瘍患者に投与し発現させることで、腫瘍を治療または予防し得るものである。

例えば発現ベクターに組み込まれた本発明の核酸を以下の方法により腫瘍患者に投与すると、抗原提示細胞内で腫瘍抗原タンパク質が高発現する。その後、細胞内分解を受けて生じた腫瘍抗原ペプチドがHLA抗原と結合して複合体を形成し、該複合体が抗原提示細胞表面に高密度に提示されることにより、腫瘍特異的CTLが体内で効率的に増殖し、腫瘍細胞を破壊する。以上のようにして、腫瘍の治療または予防が達成される。

本発明の核酸を有効成分とするCTLの誘導剤は、配列番号：1に記載のPBF遺伝子および当該遺伝子の発現産物であるPBF陽性の如何なる腫瘍患者に対しても使用することができる。具体的には、例えば骨肉腫などの肉腫全般または腎癌などの癌の予防または治療のために使用することができる。

本発明の核酸を投与し細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターによる方法およびその他の方法（日経サイエンス，1994年4月号，20-45頁、月刊薬事，36(1)，23-48(1994)、実験医学増刊，12(15)，(1994)、およびこれらの引用文献等）のいずれの方法も適用することができる。

ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス

、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のDNAウイルス又はRNAウイルスに本発明のDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

本発明の核酸を実際に医薬として作用させるには、当該核酸を直接体内に導入する *in vivo*法、およびヒトからある種の細胞を採集し体外で核酸を該細胞に導入しその細胞を体内に戻す *ex vivo*法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、およびこれらの引用文献等）。*in vivo*法がより好ましい。

*in vivo*法により投与する場合は、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等に投与することができる。*in vivo*法により投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態を取りうるが、一般的には有効成分である本発明の核酸を含有する注射剤等とされ、必要に応じて、医薬上許容されるキャリアー（担体）を加えてもよい。また、本発明の核酸を含有するリポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス（HVJ）-リポソーム等）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができる。

製剤中の本発明の核酸の含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常、核酸中のポリヌクレオチドの含量として、0.001mg～100mg、好ましくは0.001mg～10mgの本発明の核酸を、数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

また近年、複数のCTLエピトープ（腫瘍抗原ペプチド）を連結したエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチド、あるいはCTLエピトープとヘルパーエピトープとを連結させたエピトープペプチドをコードするポリヌクレオチドが、*in vivo*

oで効率的にCTL誘導活性を有することが示されている。例えばJournal of Immunology 1999, 162: 3915-3925には、HBV由来HLA-A2拘束性抗原ペプチド6種類、HLA-A11拘束性抗原ペプチド3種類、およびヘルパーエпитープを連結したエпитープペプチドをコードするDNA（ミニジーン）が、イン・ビボでそれぞれのエピトープに
5 対するCTLを効果的に誘導したことが記載されている。

従って、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを1種または2種以上連結させることにより、また場合によっては他のペプチドをコードするポリヌクレオチドも連結させることにより作製されたポリヌクレオチドを、適当な発現ベクターに組み込むことにより、CTLの誘導剤の有効成分とすることができる。このよう
10 なCTLの誘導剤も、前記と同様の投与方法および投与形態をとることができる。

7) 本発明の抗原提示細胞

前記した本発明のタンパク質、ペプチドおよび核酸は、腫瘍患者の治療において、以下のようにイン・ビトロで利用することができる。すなわち本発明のタンパク質、ペプチドおよび核酸のいずれかと抗原提示能を有する細胞とをイン・ビトロで
15 接触させることにより、抗原提示細胞を作製することができる。具体的には本発明は、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞と、本発明のタンパク質、ペプチドおよび核酸のいずれかとをイン・ビトロで接触させることにより、当該細胞の細胞表面にHLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を提示させた抗原提示細胞、およびその製造方法を提供するものである。

ここで「抗原提示能を有する細胞」とは、本発明のペプチドを提示することの可能なHLA抗原を細胞表面に発現する細胞であれば特に限定されないが、特に抗原提示能が高いとされる樹状細胞が好ましい。

また、前記抗原提示能を有する細胞から本発明の抗原提示細胞を調製するために添加される物質としては、本発明のタンパク質、ペプチドおよび核酸のいずれであ
25 っても良い。

本発明の抗原提示細胞は、腫瘍患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、該細胞に本発明のタンパク質またはペプチドをイン・ビトロでパルスして、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を提示させることにより得られる(Cancer Immunol. Immunother., 46:82, 1998、J. Immunol., 158, p1796, 1997、Cancer Res., 59, p1184, 1

999)。樹状細胞を用いる場合は、例えば、腫瘍患者の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離し、その後非付着細胞を除き、付着細胞をGM-CSFおよびIL-4存在下で培養して樹状細胞を誘導し、当該樹状細胞を本発明のタンパク質またはペプチドと共に培養してパルスすることなどにより、本発明の抗原提示細胞を調製することができる。

また、前記抗原提示能を有する細胞に本発明の核酸を導入することにより本発明の抗原提示細胞を調製する場合は、当該核酸は、DNAの形態であっても、RNAの形態であっても良い。具体的には、DNAの場合は Cancer Res., 56:p5672, 1996 や J. Immunol., 161: p5607, 1998などを参考にして行うことができ、またRNAの場合は J. Exp. Med., 184: p465, 1996などを参考にして行うことができる。

前記抗原提示細胞はCTLの誘導剤の有効成分とすることができる。当該抗原提示細胞を有効成分として含有するCTLの誘導剤は、抗原提示細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。このような抗原提示細胞を有効成分として含有してなるCTLの誘導剤を患者の体内に戻すことにより、本発明のPBF陽性の患者の体内で効率良く特異的なCTLが誘導され、腫瘍を治療することができる。

8) 本発明のCTL

本発明のタンパク質、ペプチドおよび核酸は、腫瘍患者の治療において、以下のようにイン・ビトロで利用することができる。すなわち本発明のタンパク質、ペプチドおよび核酸のいずれかと末梢血リンパ球とをイン・ビトロで接触させることにより、CTLを誘導することができる。具体的には本発明は、腫瘍患者由来の末梢血リンパ球と、本発明のタンパク質、ペプチドおよび核酸のいずれかとをイン・ビトロで接触させることにより誘導されたCTL、およびその誘導方法を提供するものである。

例えばメラノーマにおいては、患者本人の腫瘍内浸潤T細胞を体外で大量に培養して、これを患者に戻す養子免疫療法に治療効果が認められている(J. Natl. Cancer Inst., 86:1159、1994)。またマウスのメラノーマにおいては、脾細胞をイン・ビトロで腫瘍抗原ペプチドTRP-2で刺激し、腫瘍抗原ペプチドに特異的なCT

Lを増殖させ、該CTLをメラノーマ移植マウスに投与することにより、転移抑制が認められている（J. Exp. Med., 185:453, 1997）。これは、抗原提示細胞のHLA抗原と腫瘍抗原ペプチドとの複合体を特異的に認識するCTLをイン・ビトロで増殖させた結果に基づくものである。従って、本発明のタンパク質、ペプチドまたは

5 核酸を用いて、イン・ビトロで患者末梢血リンパ球を刺激して腫瘍特異的CTLを増やした後、このCTLを患者に戻す治療法は有用であると考えられる。

当該CTLは腫瘍の治療剤または予防剤の有効成分とすることができる。該治療剤または予防剤は、CTLを安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、

10 皮下投与、皮内投与が挙げられる。このようなCTLを有効成分として含有してなる腫瘍の治療または予防剤を患者の体内に戻すことにより、本発明のPBF陽性の患者の体内でCTLによる腫瘍細胞の傷害作用が促進され、腫瘍細胞を破壊することにより、腫瘍を治療することができる。

9) 本発明のペプチドに対する抗体

15 本発明は、本発明のペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。本発明の抗体は、その形態に特に制限はなく、本発明のペプチドを免疫抗原とするポリクローナル抗体であっても、またモノクローナル抗体であっても良い。

本発明の抗体は前記のように本発明のペプチドに特異的に結合するものであれば特に制限されないが、具体的には、配列番号：6～55のいずれかに記載のアミノ酸

20 配列からなる腫瘍抗原ペプチドに特異的に結合する抗体を挙げることができる。

これらの抗体の製造方法は、すでに周知であり、本発明の抗体もこれらの常法に従って製造することができる（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.12～11.13, Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H, D.ら編, Cold Spring Harbor Laboratory Press 出版 New York 1989）。

25

具体的には、本発明のペプチド（例えば配列番号：6～55のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる腫瘍抗原ペプチド）を免疫原として用い、家兎等の非ヒト動物を免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体の場合には、本発明のペプチド（例えば配列番号：6～55のいずれ

かに記載のアミノ酸配列からなる腫瘍抗原ペプチド)をマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞の中から得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4~11.11)

5 。

本発明のペプチドに対する抗体の作製は、宿主に応じて種々のアジュバントを用いて免疫学的反応を高めることによって行うこともできる。そのようなアジュバントには、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、並びにリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キ
10 ーホールリンペットヘモシアニンおよびジニトロフェノールのような表面活性物質、BCG (カルメットーグラン桿菌) やコリネバクテリウム・パルヴムなどのヒトアジュバントなどがある。

以上のように本発明のペプチドを用いて常法により適宜動物を免疫することにより、ペプチドを認識する抗体、さらにはその活性を中和する抗体が容易に作製でき
15 る。抗体の用途としては、アフィニティークロマトグラフィー、免疫学的診断等が挙げられる。免疫学的診断は、イムノプロット法、放射免疫測定法 (RIA)、酵素免疫測定法 (ELISA)、蛍光あるいは発光測定法等より適宜選択できる。このような免疫学的診断は、本発明のPBF遺伝子が発現している癌、例えば肉腫や腎癌等の診断において有効である。

20 10) 腫瘍マーカー

① 本発明のポリヌクレオチドに関する腫瘍マーカー

本発明においては、配列番号：1に記載のPBF遺伝子が、正常細胞に比して肉腫および腎癌において特異的に高発現しているという知見を得た。よって、当該遺伝子発現の有無や発現の程度を検出することによって、腫瘍、特に肉腫や腎癌の有無や
25 程度が特異的に検出でき、該疾患の診断を行うことができる。

本発明のポリヌクレオチドは、従って、被験者におけるPBF遺伝子の発現の有無またはその程度を検出することによって、該被験者が腫瘍に罹患しているか否かまたはその罹患の程度を診断することのできるツール (腫瘍マーカー) として有用である。

本発明の腫瘍マーカーは、前記本発明ポリヌクレオチド（配列番号：2に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド）の塩基配列において、連続する少なくとも15塩基を含有するポリヌクレオチド及び／またはそれに相補的なポリヌクレオチドからなることを特徴とするものである。

具体的には、本発明の腫瘍マーカーは、配列番号：1または3に記載の塩基配列において、連続する少なくとも15塩基を含有するポリヌクレオチド及び／またはそれに相補的なポリヌクレオチドからなるものを挙げることができる。

ここで相補的なポリヌクレオチド（相補鎖、逆鎖）とは、前記配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドの全長配列、または該塩基配列において少なくとも連続した15塩基長の塩基配列を含有するその部分配列（ここでは便宜上、これらを「正鎖」ともいう）に対して、A:TおよびG:Cといった塩基対関係に基づいて、塩基的に相補的な関係にあるポリヌクレオチドを意味するものである。ただし、かかる相補鎖は、対象とする正鎖の塩基配列と完全に相補配列を形成する場合に限らず、対象とする正鎖とストリンジェントな条件でハイブリダイズすることができる程度の相補関係を有するものであってもよい。なお、ここでストリンジェントな条件は、Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA) に教示されるように、複合体或いはプローブを結合する核酸の融解温度(T_m)に基づいて決定することができる。例えばハイブリダイズ後の洗浄条件として、通常「 $1 \times$ SSC、0.1%SDS、 37°C 」程度の条件を挙げるることができる。相補鎖はかかる条件で洗浄しても対象とする正鎖とハイブリダイズ状態を維持するものであることが好ましい。特に制限されないが、より厳しいハイブリダイズ条件として「 $0.5 \times$ SSC、0.1% SDS、 42°C 」程度、さらに厳しいハイブリダイズ条件として「 $0.1 \times$ SSC、0.1% SDS、 65°C 」程度の洗浄条件を挙げるることができる。具体的には、このような相補鎖として、対象の正鎖の塩基配列と完全に相補的な関係にある塩基配列からなる鎖、並びに該鎖と少なくとも90%、好ましくは95%の相同性を有する塩基配列からなる鎖を例示することができる。

ここで、正鎖側のポリヌクレオチドには、配列番号：1または3に記載の塩基配列

、またはその部分配列を含有するものだけでなく、上記相補鎖の塩基配列に対してさらに相補的な関係にある塩基配列からなる鎖を含めることができる。

さらに上記正鎖のポリヌクレオチド及び相補鎖（逆鎖）のポリヌクレオチドは、各々一本鎖の形態で腫瘍マーカーとして使用されても、また二本鎖の形態で腫瘍マーカーとして使用されてもよい。

本発明の腫瘍マーカーは、具体的には、前記配列番号：1または3に記載の塩基配列（全長配列）からなるポリヌクレオチドであってもよいし、その相補配列からなるポリヌクレオチドであってもよい。またこれら本発明遺伝子もしくは該遺伝子に由来するポリヌクレオチドを選択的に（特異的に）認識するものであれば、上記全長配列またはその相補配列の部分配列からなるポリヌクレオチドであってもよい。この場合、部分配列としては、上記全長配列またはその相補配列の塩基配列から任意に選択される少なくとも15個の連続した塩基長を含有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

なお、ここで「選択的に（特異的に）認識する」とは、例えばノーザンブロット法においては、本発明のPBF遺伝子、またはこれらに由来するポリヌクレオチドが特異的に検出できること、またRT-PCR法においては、本発明のPBF遺伝子、またはこれらに由来するポリヌクレオチドが特異的に生成されることを意味するが、それに限定されることなく、当業者が上記検出物または生成物がPBF遺伝子に由来するものであると判断できるものであればよい。

本発明の腫瘍マーカーは、例えば配列番号1又は3に記載の塩基配列をもとに、例えばprimer 3（HYPERLINK <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>）あるいはベクターNTI（Infomax社製）を利用して設計することができる。具体的には前記本発明遺伝子の塩基配列を primer 3またはベクターNTIのソフトウェアにかけて得られる、プライマーまたはプローブの候補配列、若しくは少なくとも該配列を一部に含む配列をプライマーまたはプローブとして使用することができる。このような本発明の腫瘍マーカーの具体例としては、例えば配列番号：4または5に記載のプライマーを挙げることができる。

本発明の腫瘍マーカーは、上述するように連続する少なくとも15塩基の長さを含むものであるが、具体的にはマーカーの用途に応じて、長さを適宜選択

し設定することができる。

本発明において腫瘍の検出（診断）は、被験者の生体組織、特に腫瘍（肉腫や腎癌）が疑われる被験組織におけるPBF遺伝子の発現の有無または発現レベル（発現量）を評価することによって行われる。この場合、上記本発明の腫瘍マーカーは、
5 PBF遺伝子の発現によって生じたRNAまたはそれに由来するポリヌクレオチドを特異的に認識し増幅するためのプライマーとして、または該RNAまたはそれに由来するポリヌクレオチドを特異的に検出するためのプローブとして利用することができる。

本発明腫瘍マーカーを腫瘍の検出においてプライマーとして用いる場合には、通常15bp～100bp、好ましくは15bp～50bp、より好ましくは15bp～35bpの塩基長を含有するものが例示できる。また検出プローブとして用いる場合には、通常15bp～全配列の塩基数、好ましくは15bp～1kb、より好ましくは100bp～1kbの塩基長を含有するものが例示できる。

本発明の腫瘍マーカーは、ノーザンブロット法、RT-PCR法、in situハイブリダイゼーション法などといった、特定遺伝子の特異的に検出する公知の方法において、
15 常法に従ってプライマーまたはプローブとして利用することができる。

本発明の腫瘍マーカーは、腫瘍の診断、検出（罹患の有無や罹患の程度の診断）に有用である。具体的には、該腫瘍マーカーを利用した腫瘍の診断は、被験者における生体組織（腫瘍が疑われる組織）と正常者における同様の組織におけるPBF遺伝子の遺伝子発現レベルの違いを判定することによって行うことができる。この場合、遺伝子発現レベルの違いには、発現のある／なしの違いだけでなく、被験者の組織と正常者の組織の両者ともに発現がある場合でも、両者間の発現量の格差が2倍以上、好ましくは3倍以上の場合が含まれる。具体的にはPBF遺伝子は腫瘍で発現誘導を示すので、被験者の組織で発現しており、該発現量が正常者の対応組織の発現量と比べて2倍以上、好ましくは3倍以上多ければ、被験者について腫瘍の罹患が
20 疑われる。
25

②本発明の抗体に関する腫瘍マーカー

本発明は腫瘍マーカーとして、本発明のタンパク質又はその部分ペプチド（本発明のペプチドを含む）を特異的に認識することのできる抗体（以下、本発明の抗体

と称する場合がある)を提供する。より具体的には、本発明は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる本発明のタンパク質またはその部分ペプチド（本発明のペプチドを含む）を特異的に認識する抗体からなる腫瘍マーカーを提供する。

本発明においては、種々の肉腫および腎癌において、本発明のPBF遺伝子が特異的に高発現しているという知見を得た。よってこれらの遺伝子の発現産物（タンパク質）の有無やその発現の程度を検出することによって、上記腫瘍（肉腫、腎癌等）の有無やその程度が特異的に検出でき、該疾患の診断を行うことができる。

上記抗体は、従って、被験者における上記タンパク質の発現の有無またはその程度を検出することによって、該被験者が腫瘍に罹患しているか否かまたはその疾患の程度を診断することのできるツール（腫瘍マーカー）として有用である。

本発明の抗体は、その形態に特に制限はなく、本発明タンパク質（具体的には配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるPBFタンパク質）を免疫抗原とするポリクローナル抗体であっても、またそのモノクローナル抗体であってもよい。さらにこれら本発明タンパク質のアミノ酸配列のうち少なくとも連続する、通常8アミノ酸、好ましくは15アミノ酸、より好ましくは20アミノ酸からなるポリペプチドに対して抗原結合性を有する抗体も、本発明の抗体に含まれる。

これらの抗体の製造方法は、すでに周知であり、本発明の抗体もこれらの常法に従って製造することができる（Current Protocol in Molecular Biology, Chapter 11.12～11.13(2000)）。具体的には、本発明の抗体がポリクローナル抗体の場合には、常法に従って大腸菌等で発現し精製した本発明タンパク質を用いて、あるいは常法に従ってこれら本発明タンパク質の部分アミノ酸配列を含有するオリゴペプチドを合成して、家兎等の非ヒト動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体の場合には、常法に従って大腸菌等で発現し精製した本発明タンパク質、あるいはこれらタンパク質の部分アミノ酸配列を含有するオリゴペプチドをマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞の中から得ることができる（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4～11.11）。

抗体の作製に免疫抗原として使用される本発明タンパク質（具体的には配列番号

: 2に記載のアミノ酸配列よりなるPBFタンパク質)は、本発明により提供される遺伝子の配列情報(配列番号1, 3)に基づいて、DNAクローニング、各プラスミドの構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換体の培養および培養物からのタンパク質の回収の操作により得ることができる。これらの操作は、当業者に既知の方法、あるいは文献記載の方法(Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983), DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985))などに準じて行うことができる。また本発明タンパク質の部分ペプチドは、本発明により提供されるアミノ酸配列の情報(配列番号: 2)に従って、一般的な化学合成法(ペプチド合成)によって製造することもできる。詳しくは前述の1)~3)の項を参照されたい

。

本発明の抗体は、また、本発明タンパク質の部分アミノ酸配列を含有するオリゴペプチドを用いて調製されるものであってよい。かかる抗体の製造のために用いられるオリゴ(ポリ)ペプチドは、機能的な生物活性を有することは要しないが、本発明タンパク質と同様な免疫原特性を有するものであることが望ましい。好ましくはこの免疫原特性を有し、且つ本発明タンパク質のアミノ酸配列において少なくとも連続する8アミノ酸、好ましくは15アミノ酸、より好ましくは20アミノ酸からなるオリゴ(ポリ)ペプチドを例示することができる。

かかるオリゴ(ポリ)ペプチドに対する抗体の製造は、宿主に応じて種々のアジュバントを用いて免疫学的反応を高めることによって行うこともできる。限定はされないが、そのようなアジュバントには、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、並びにリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン及びジニトロフェノールのような表面活性物質、BCG(カルメットーグラン桿菌)やコリネバクテリウム-パルヴムなどのヒトアジュバントが含まれる。

本発明の抗体は、PBFタンパクに特異的に結合する性質を有することから、該抗体を利用することによって、被験者の組織内に発現した上記タンパク質を特異的に検出することができる。すなわち、当該抗体は被験者の組織内におけるPBF発現の有無を検出するためのプローブとして有用である。

具体的には、腫瘍が疑われる被験組織や血液をバイオプシ等で採取し、そこから

47

常法に従ってタンパク質を調製して、例えばウェスタンブロット法、ELISA法など公知の検出方法において、上記抗体を常法に従ってプローブとして使用することによってPBFを検出することができる。

- 5 腫瘍の診断に際しては、被験者組織におけるPBFタンパクの量と正常な対応組織におけるPBFタンパク量の違いを判定すればよい。この場合、タンパク量の違いには、タンパクのある／なし、あるいはタンパク量の違いが2倍以上、好ましくは3倍以上の場合が含まれる。具体的にはPBF遺伝子は腫瘍(肉腫、腎癌)で発現誘導を示すので、被験者組織で該遺伝子の発現産物(PBF)が存在しており、該量が正常な組織の発現産物量と比べて2倍以上、好ましくは3倍以上多いことが判定されれば、
10 腫瘍の罹患が疑われる。

③本発明のタンパク質またはペプチドに関する腫瘍マーカー

- 本発明は腫瘍マーカーとして、本発明のタンパク質又はその部分ペプチドに対する抗体を特異的に認識することのできるタンパク質またはペプチドを提供する。より具体的には、本発明は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる本発明のタンパク質またはその部分ペプチドからなる腫瘍マーカーを提供する。
15

ここで腫瘍マーカーの成分とされる本発明タンパク質の部分ペプチドとしては、本発明タンパク質のアミノ酸配列のうち少なくとも連続する、通常8アミノ酸、好ましくは15アミノ酸、より好ましくは20アミノ酸からなるポリペプチドを挙げることができる。

- 20 本発明のタンパク質やペプチド(ポリペプチド)を診断薬として用い、腫瘍が疑われる患者から得た試料(例えば血液、腫瘍が疑われる組織など)中の抗体の存在を検出することにより、腫瘍を診断することが可能である。ここで用いる本発明タンパク質およびペプチドの製造法については、前記1)および2)の項で述べたとおりである。

- 25 具体的には、患者の血液を採取するか、若しくは腫瘍が疑われる被験組織をバイオプシ等で採取し、そこから常法に従ってタンパク質を調製して、例えばウェスタンブロット法、ELISA法など公知の検出方法において、上記本発明タンパク質またはペプチドを常法に従ってプローブとして使用することによって、PBFに対する抗体を検出することができる。

腫瘍の診断に際しては、被験者組織における抗PBF抗体の量と正常な対応組織における抗PBF抗体の量の違いを判定すればよい。この場合、タンパク量の違いには、タンパクのある／なし、あるいはタンパク量の違いが2倍以上、好ましくは3倍以上の場合が含まれる。具体的にはPBF遺伝子は腫瘍(肉腫、腎癌)で発現誘導を示すので、被験者組織で該遺伝子の発現産物(PBF)に対する抗体が存在しており、この抗PBF抗体の量が正常な組織での抗PBF抗体量と比べて2倍以上、好ましくは3倍以上多いことが判定されれば、腫瘍の罹患が疑われる。

④HLAテトラマーに関する腫瘍マーカー

本発明はまた、本発明のペプチドとHLA抗原とを含有するHLAテトラマー、および当該HLAテトラマーからなる腫瘍マーカーを提供する。

ここでHLAテトラマーとは、HLA抗原の α 鎖と β 2ミクログロブリンをペプチド(抗原ペプチド)と会合させた複合体(HLAモノマー)をビオチン化し、アビジンに結合させることにより4量体化したものを指す(Science 279: 2103-2106(1998)、Science 274: 94-96 (1996))。現在では種々の抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーが市販されており(例えば(株)医学生物学研究所)、本発明のペプチドとHLA抗原とを含有するHLAテトラマーを容易に作製することができる。

具体的には、例えば配列番号: 6~45のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる腫瘍抗原ペプチドとHLA-A24抗原とを含有するHLAテトラマー、または、配列番号: 46~55のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる腫瘍抗原ペプチドとHLA-B55抗原とを含有するHLAテトラマーが挙げられる。

当該HLAテトラマーは、フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡等の公知の検出手段により結合したCTLを容易に選別または検出することが出来るように蛍光標識されていることが好ましい。具体的には、例えばフィコエリスリン(PE)、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ペリジニクロロフィルプロテイン(PerCP)などにより標識されたHLAテトラマーが挙げられる。

HLAテトラマーの成分であるHLA-A24抗原(HLA-A24抗原の α 鎖)は、Cancer Res., 55: 4248-4252 (1995)およびGenbank Accession No. M64740に開示されているHLA-A2402遺伝子の公知の塩基配列の情報に基づき、PCR法等の常法により容易にクローニングすることができる。またHLA-B55抗原の場合も、HLA-B5502遺伝子(GenBan

k Acc.No.M77777、J. Immunol., 148(4), 1155-1162(1992)) の公知の塩基配列の情報に基づきクローニングすることができる。

HLAテトラマーの成分である $\beta 2$ ミクログロブリンは、ヒト由来の $\beta 2$ ミクログロブリンが好ましい。当該ヒト $\beta 2$ ミクログロブリンは GenBank Acc.No. AB021288

5 に開示されているヒト $\beta 2$ ミクログロブリンの公知の塩基配列情報に基づき、PCR法等の常法により容易にクローニングすることができる。

以上のHLAテトラマーの成分を含有するHLAテトラマーの作製法については、文献 (Science 279: 2103-2106(1998)、Science 274: 94-96 (1996)等) により周知であるが、HLA-A24抗原を例にとり簡単に述べると以下のようなになる。

10 まずタンパク質を発現可能な大腸菌や哺乳動物細胞に、HLA-A24 α 鎖発現ベクターおよび $\beta 2$ ミクログロブリン発現ベクターを導入し発現させる。ここでは大腸菌 (例えばBL21) を用いることが好ましい。得られた単量体HLA-A24複合体と本発明ペプチドとを混合し、可溶性のHLA-ペプチド複合体を形成させる。次にHLA-ペプチド複合体におけるHLA-A24 α 鎖のC末端部位の配列をBirA酵素によりビオチン化する

15 。このビオチン化されたHLA-ペプチド複合体と蛍光標識されたアビジンとを4:1のモル比で混合することにより、HLAテトラマーを調製することができる。なお、前記各ステップにおいて、ゲルろ過等によるタンパク精製を行うことが好ましい。

⑤腫瘍の検出方法 (診断方法)

本発明は、前述した本発明腫瘍マーカーを利用した腫瘍の検出方法 (診断方法)

20 を提供するものである。

具体的には、本発明の検出方法 (診断方法) は、被験者の血液を採取するか、若しくは腫瘍が疑われる被験組織の一部をバイオプシ等で採取し、そこに含まれるPBF遺伝子の遺伝子発現レベル、これらの遺伝子に由来するPBFタンパク質の量、当該PBFに対する抗体の量、若しくはPBF由来の腫瘍抗原ペプチドとHLA抗原との複合体

25 を認識するCTLの量を、検出・測定することにより、肉腫や腎癌等の腫瘍の罹患の有無またはその程度を診断するものである。また本発明の検出 (診断) 方法は、例えば腫瘍患者において、該腫瘍の改善のために治療薬を投与した場合における、該疾患の改善の有無またはその程度を検出 (診断) することもできる。さらに本発明の検出 (診断) 方法は、本発明のタンパク質、ペプチドまたは核酸を有効成分とす

る医薬の適応可能な腫瘍患者の選択や、当該医薬による治療効果の判定などにも利用できる。

本発明の検出方法は次の(a)、(b)及び(c)の工程を含むものである：

(a) 被験者の生体試料と本発明の腫瘍マーカーを接触させる工程、

5 (b) 生体試料中のPBF遺伝子発現レベル、PBFタンパク質量、抗PBF抗体量、またはPBF由来の腫瘍抗原ペプチドとHLA抗原との複合体を認識するCTLの量を、上記腫瘍マーカーを指標として測定する工程、

(c) (b)の結果をもとに、腫瘍の罹患を判断する工程。

10 ここで用いられる生体試料としては、被験者の生体組織（腫瘍が疑われる組織及びその周辺組織、または血液など）から調製される試料を挙げることができる。具体的には、該組織から調製されるRNA含有試料、若しくはそれからさらに調製されるポリヌクレオチドを含む試料、または上記組織から調製されるタンパク質、抗体を含む試料、あるいは上記組織から調製される末梢血リンパ球を含む試料を挙げることができる。

15 本発明の診断方法は、測定対象として用いる生体試料の種類に応じて、具体的には下記のようにして実施される。

(⑤-1) 測定対象の生体試料としてRNAを利用する場合

測定対象物としてRNAを利用する場合、腫瘍の検出は、具体的に下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む方法によって実施することができる：

20 (a)被験者の生体試料から調製されたRNAまたはそれから転写された相補的ポリヌクレオチドと、前記本発明の腫瘍マーカー（本発明のポリヌクレオチドの塩基配列において連続する少なくとも15塩基を含有するポリヌクレオチド及び/又は該ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド）とを結合させる工程、

(b)該腫瘍マーカーに結合した生体試料由来のRNAまたは該RNAから転写された相補的ポリヌクレオチドを、上記腫瘍マーカーを指標として測定する工程、

25 (c)上記(b)の測定結果に基づいて、腫瘍の罹患を判断する工程。

測定対象物としてRNAを利用する場合は、本発明の検出方法（診断方法）は、該RNA中のPBF遺伝子の発現レベルを検出し、測定することによって実施される。具体的には、前述のポリヌクレオチドからなる本発明の腫瘍マーカー（本発明のポリヌ

クレオチドの塩基配列において連続する少なくとも15塩基を含有するポリヌクレオチド及び／又はその相補的なポリヌクレオチド)をプライマーまたはプローブとして用いて、ノーザンブロット法、RT-PCR法、DNAチップ解析法、in situハイブリダイゼーション解析法などの公知の方法を行うことにより実施できる。

- 5 ノーザンブロット法を利用する場合は、本発明の上記腫瘍マーカーをプローブとして用いることによって、RNA中のPBF遺伝子の発現の有無やその発現レベルを検出、測定することができる。具体的には、本発明の腫瘍マーカー（相補鎖）を放射性同位元素（ ^{32}P 、 ^{33}P など：RI）や蛍光物質などで標識し、それを、常法に従ってナイロンメンブレン等にトランスファーした被験者の生体組織由来のRNAとハイブリ
- 10 ダイズさせた後、形成された腫瘍マーカー（DNA）とRNAとの二重鎖を、腫瘍マーカーの標識物（RI若しくは蛍光物質）に由来するシグナルを放射線検出器（BAS-1800 II、富士フイルム社製）または蛍光検出器で検出、測定する方法を例示することができる。また、AlkPhos Direct Labelling and Detection System（Amersham Pharmacia Biotech社製）を用いて、該プロトコールに従って腫瘍マーカー（プローブDN
- 15 A）を標識し、被験者の生体組織由来のRNAとハイブリダイズさせた後、腫瘍マーカーの標識物に由来するシグナルをマルチバイオイメージャーSTORM860（Amersham Pharmacia Biotech社製）で検出、測定する方法を使用することもできる。

- RT-PCR法を利用する場合は、本発明の上記腫瘍マーカーをプライマーとして用いることによって、RNA中のPBF遺伝子の発現の有無や発現レベルを検出、測定することが
- 20 できる。具体的には、被験者の生体組織由来のRNAから常法に従ってcDNAを調製して、これを鋳型として標的のPBF遺伝子の領域が増幅できるように、本発明の腫瘍マーカーから調製した一対のプライマー（上記cDNA（-鎖）に結合する正鎖、+鎖に結合する逆鎖）をこれとハイブリダイズさせて、常法に従ってPCR法を行い、得られた増幅二本鎖DNAを検出する方法を例示することができる。なお
- 25 、増幅された二本鎖DNAの検出は、上記PCRを予めRIや蛍光物質で標識しておいたプライマーを用いて行うことによって産生される標識二本鎖DNAを検出する方法、産生された二本鎖DNAを常法に従ってナイロンメンブレン等にトランスファーさせて、標識した腫瘍マーカーをプローブとして使用してこれとハイブリダイズさせて検出する方法などを用いることができる。なお、生成された標識二本鎖D

NA産物はアジレント2100バイオアナライザ（横河アナリティカルシステムズ社製）などで測定することができる。また、SYBR Green RT-PCR Reagents（Applied Biosystems 社製）で該プロトコールに従ってRT-PCR反応液を調製し、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System（Applied Biosystems 社製）で反応させて、該反応物を検出することもできる。

DNAチップ解析を利用する場合は、本発明の上記腫瘍マーカーをDNAプローブ（1本鎖または2本鎖）として貼り付けたDNAチップを用意し、これに被験者の生体組織由来のRNAから常法によって調製されたcRNAとハイブリダイズさせて、形成されたDNAとcRNAとの二本鎖を、本発明の腫瘍マーカーから調製される標識プローブと結合させて検出する方法を挙げることができる。

（⑤-2）測定対象の生体試料としてタンパク質を用いる場合

測定対象物としてタンパク質を用いる場合は、本発明の腫瘍の検出方法（診断方法）は、生体試料中のPBFを検出し、その量を測定することによって実施される。具体的には下記の工程(a)、(b)及び(c)を含む方法によって実施することができる：

(a)被験者の生体試料から調製されたタンパク質と抗体に関する本発明の腫瘍マーカー（PBFを認識する抗体）とを結合させる工程、

(b)該腫瘍マーカーに結合した生体試料由来のタンパク質を、上記腫瘍マーカーを指標として測定する工程、

(c)上記(b)の測定結果に基づいて、腫瘍の罹患を判断する工程。

より具体的には、本発明の腫瘍マーカーとして抗体（PBFを認識する抗体）を用いて、ウエスタンブロット法などの公知方法でPBFを検出、定量する方法を挙げることができる。

ウエスタンブロット法は、一次抗体として本発明腫瘍マーカーを用いた後、二次抗体として ^{125}I などの放射性同位元素、蛍光物質、ホースラディッシュペルオキシターゼ（HRP）などの酵素等で標識した標識抗体（一次抗体に結合する抗体）を用い、得られる標識化合物の放射性同位元素、蛍光物質などに由来するシグナルを放射線測定器（BAS-1800II：富士フイルム社製など）、蛍光検出器などで検出し、測定することによって実施できる。また、一次抗体として本発明腫瘍マーカーを用

いた後、ECL Plus Western Blotting Detection System (アマシヤム ファルマシアバイオテク社製)を用いて、該プロトコールに従って検出し、マルチバイオイメージャーSTORM860(アマシヤム ファルマシアバイオテク社製)で測定することもできる。

5 (⑤-3) 測定対象の生体試料として抗体を用いる場合

測定対象物としてタンパク質中に存在する抗体を用いる場合は、本発明の腫瘍の検出方法(診断方法)は、生体試料中の抗PBF抗体を検出し、その量を測定することによって実施される。具体的にはタンパク質またはペプチドに関する本発明の腫瘍マーカーを用い、前記(⑤-2)と同様の手法にて行うことができる。

10 (⑤-4) 測定対象の生体試料として腫瘍抗原特異的CTLを用いる場合

測定対象物として末梢血リンパ球中に存在する腫瘍抗原特異的CTLを用いる場合は、本発明の腫瘍の検出方法(診断方法)は、生体試料中のPBF特異的CTLを検出し、その量を測定することによって実施される。具体的には、文献(Science, 274:p94, 1996)に記載の方法に従って蛍光標識したHLA抗原と本発明のペプチドとの複合体の4量体(HLAテトラマー)を作製し、これを用いて腫瘍が疑われる患者の末梢血リンパ球中の抗原ペプチド特異的CTLをフローサイトメーターにより定量することにより行うことができる。

(⑤-5)腫瘍の診断

20 腫瘍の診断は、例えば、被験者の血液や腫瘍が疑われる被験組織におけるPBF遺伝子の遺伝子発現レベル、これらの遺伝子の発現産物であるPBFタンパク質の量、抗PBF抗体の量、またはPBF特異的CTLの量を測定することにより行うことができる。その際、場合によっては正常な対応組織における当該遺伝子発現レベルまたは当該タンパク質レベル等と比較し、両者の違いを判定することによって行うことができる。

25 ここで被験者の被験組織と正常な対応組織との遺伝子、タンパク質、抗体、またはCTLの量(レベル)の比較は、被験者の生体試料と正常者の生体試料を対象とした測定を並行して行うことで実施できる。並行して行わない場合は、複数(少なくとも2つ、好ましくは3以上、より好ましくは5以上)の正常な組織を用いて均一な測定条件で測定して得られたPBF遺伝子の遺伝子発現レベル、PBFの量、抗PBF抗

体の量、またはPBF特異的CTLの量の平均値または統計的中間値を、正常者の値として、比較に用いることができる。

被験者が、腫瘍であるかどうかの判断は、例えば該被験者の組織におけるPBF遺伝子の遺伝子発現レベル、PBFの量、抗PBF抗体の量、またはPBF特異的CTLの量が、
5 正常者のそれらのレベルと比較して2倍以上、好ましくは3倍以上多いことを指標として行うことができる。

実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により
10 らなんら限定されるものではない。

実施例 1

骨肉腫細胞株とそれに対する細胞傷害性T細胞 (CTL) の樹立

骨肉腫患者より生検で取り出された骨肉腫組織から、骨肉腫細胞株を樹立し、OS
2000と命名した。同じ骨肉腫患者より採取した血液から、Lymphoprep (Nycomed社)
15 を用いた比重遠心法により末梢血単核球を回収し、放射線照射して不活化したOS20
00を10日おきに6回添加して、刺激を加えながら培養した。その後、抗CD8抗体を結
合した磁気ビーズ (Macs, Miltenyi社) を用いてCD8陽性の細胞を濃縮し、限界希
釈法を用いてCTL株の樹立を行った (Int. J. Cancer, 39, 390-396, 1987, N. Eng
. J. Med, 333, 1038-1044, 1995)。OS2000に対する細胞傷害活性を指標に選別を
20 行い、3種類のCTLを得た。その中からTcOS2000c1-303と命名されたCTLを用いてそ
の後の実験を行った。OS2000のHLAクラスI分子のタイプは、HLA-A*2402、-B*5502
、-B40、Cw1であることを確認した。

実施例 2

新規な腫瘍抗原タンパク質遺伝子のスクリーニング

25 1) HLA-B55遺伝子導入細胞を用いたスクリーニング

OS2000からFirst track (Invitrogen社)を用いてmRNAを調製した。次にこのmRN
Aをもとにして、Superscript Choice System for cDNA Synthesis (Gibco-BRL社)
を用いてcDNAを作製し、これを発現ベクターpCEP4 (Invitrogen社)に組み込んでc
DNAライブラリーを調製した。

また、OS2000細胞からPCRにより単離したHLA-B*5502遺伝子 (GenBank Acc. No. M7777、J. Immunol., 148(4), 1155-1162(1992)) を293-EBNA細胞(Invitrogen社)に導入した細胞293-EBNA-B55を準備した。

第1回目のスクリーニングとして以下の操作を行った。293-EBNA-B55細胞を96ウェルマイクロプレートにウェル当たり 8×10^4 個加え、約100個のcDNAクローンのプール(100~200 μ g)を、Lipofection法 (Lipofectamine 2000, Invitrogen社) により遺伝子導入した。遺伝子導入に用いたcDNAクローンのプールは別に保存しておいた。24時間後にTcOS2000c1-303細胞を 8×10^4 個加えてさらに24時間後に培養上清を回収し、LDH Cytotoxicity Detection Kit (タカラバイオ) を用い、細胞傷害により遊離したLDHを定量して、CTLの反応性を調べた。1000個のウェルから最も強いCTL反応性が得られたウェル1B9を選択した。次に1B9の遺伝子導入に用いたcDNAクローンプールから調製した400個のcDNAから80個のcDNAクローンプール (プール当たり8~12のcDNAクローンを含む) を用意し、上記と同様に293-EBNA-B55細胞にcDNAクローンプールを遺伝子導入し、TcOS2000c1-303細胞の反応性を指標に第2回目のスクリーニングを行った。その結果、20ウェルに反応性が認められた。さらに20ウェルのcDNAクローンプールからウェル当たり1クローンのcDNAとして上記と同様に293-EBNA-B55細胞にcDNAクローンを遺伝子導入し、TcOS2000c1-303細胞の反応性を指標に第3回目のスクリーニングを行った。その結果4ウェルに反応性が認められた。4ウェルのcDNAの塩基配列を解析したところ、同じcDNAを含んでいることが明らかとなった。このcDNAクローンを1B9.1H4と命名した。

2) HLA-A24遺伝子導入細胞を用いたスクリーニング

先のHLA-B*5502遺伝子の場合と同様にして、HLA-A*2402遺伝子 (Cancer Res., 55:4248-4252 (1995)、GenBank Accession No. M64740) を293-EBNA細胞(Invitrogen社)に導入した細胞293-EBNA-A24を準備した。先の293-EBNA-B55細胞を用いたスクリーニングと同様にスクリーニングを行い、第1回目のスクリーニングで選択したウェル2E4から、第2回目のスクリーニングで22個の反応性のウェルが得られ、第3回目のスクリーニングで4ウェルが選ばれた。4ウェルのcDNAの塩基配列を解析したところ、HLA-B*5502で選ばれたcDNAクローン1B9.1H4と同じcDNAを含んでいることが明らかとなった。

3) cDNAクローン1B9. 1H4の解析

1B9. 1H4のcDNAを、293-EBNA-B55または293-EBNA-A24に導入して発現させた時のTcOS2000c1-303の反応性を、前述のLDHリリースアッセイ（遊離LDHの定量）により測定した結果を図1に示す。またTcOS2000c1-303の反応性を⁵¹Crリリースアッセイ

5 (J. Immunol., 159:4753, 1997) により測定した結果を図2(A、B)に示す。TcOS2000c1-303は、cDNAクローン1B9. 1H4を導入して発現させた細胞を認識し、特異的に傷害活性を示した。このことより、cDNAクローン1B9. 1H4は、TcOS2000c1-303が認識する腫瘍抗原タンパク質の遺伝子をコードしていることが明らかとなった。

cDNAクローン1B9. 1H4についてBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems社)を使用して塩基配列を決定した。決定された塩基配列を、配列表の配列番号：3に示す。該cDNAの全長は1901塩基対であった。配列番号：3に記載した塩基配列を、公共のデータベースを使用して既知の配列と比較した結果、該cDNAは、GenBank Accession No. AF263928として登録されているパピローマウイルス結合因子(Papillomavirus binding factor: PBF、またPapilloma virus regulatory factor: PRF-1とも称する) (Virology 293, 103-117(2002)) と大部分が同じ塩基配列を有していた。当該PBFの塩基配列を配列番号：1に、また対応するアミノ酸配列を配列番号：2に、それぞれ示す。

次に、PBF自身が先の1B9. 1H4と同様の腫瘍抗原タンパク質活性（CTL反応性）を有するか否かを検討した。まず、OS2000細胞から抽出したRNAからcDNAを調製し、配列番号：4および配列番号：5に示すプライマーを用いてPCRを行い、PBFのcDNAを増幅した。増幅断片を発現ベクターpCEP4に組み込んで作製されたPBF遺伝子発現ベクターを、先の293-EBNA-B55または293-EBNA-A24に導入して発現させた時のTcOS2000c1-303の反応性を、LDHリリースアッセイにより測定した。結果を図3及び図4に示す。図より明らかなように、TcOS2000c1-303は、PBF遺伝子発現ベクターを導入して発現させた細胞に対しても傷害活性を示した。このことより、PBFは TcOS2000c1-303が認識する腫瘍抗原タンパク質であることが明らかとなった。

実施例3

HLA-B* 5502に結合する抗原ペプチドの同定

腫瘍抗原タンパク質PBFのアミノ酸配列（配列番号：2）を元にして種々のペプチ

ドを合成し、TcOS2000c1-303の反応性を指標にして、HLA-B*5502に結合する抗原ペプチド領域の同定を試みた。配列番号：2の499位～510位からなるペプチド：Cys Thr Ala Cys Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln Arg（配列番号：46）1mMで1時間パルスした 8×10^4 個の293-EBNA-B55細胞を、 4×10^4 個のTcOS2000c1-303細胞と混合培養し、実施例2に記載の方法と同様にLDHリリースアッセイにより反応性を調べた。結果を図5に示す。TcOS2000c1-303細胞は、ペプチドをパルスしていない293-EBNA-B55細胞には反応しなかったが、配列番号：46のペプチドをパルスした293-EBNA-B55細胞に対しては反応した。よって、配列番号：46のペプチドはHLA-B*5502に結合する抗原ペプチド領域を含んでいることが明らかとなった。

10 実施例4

各種細胞や組織でのPBF遺伝子の発現解析

腫瘍抗原タンパク質PBFをコードする遺伝子の各種細胞や組織での発現を、RT-PCR法により解析した。各細胞からIsogen reagent (Nippon Gene)を用いて抽出したRNAをもとに、オリゴdTプライマーを用いてcDNAを調製し、配列番号：4および配列番号：5に示すプライマーを用いてPCRを行い、PBFのcDNAを増幅した。その後、この増幅遺伝子を電気泳動で分離し、解析した。陽性コントロールとしてGPDH遺伝子の発現を、前記と同様にRT-PCR法を行い確認した。結果を図6に示す。PBF遺伝子は正常末梢血リンパ球やスクリーニングに使用した293-EBNA細胞では発現が認められなかったが、OS2000を含む多くの肉腫由来の細胞で発現が確認された。

20 実施例5

腎癌組織でのPBF遺伝子の発現解析

腫瘍抗原タンパク質PBFをコードする遺伝子の腎癌組織と正常腎組織での発現を、DNAチップを用いて解析した。DNAチップ解析はWO 03/048359号公報等に記載の常法により行った。その結果、腎癌組織91例の発現量の中央値が780であったのに対し、正常腎組織67例の発現量の中央値は89であり、腎癌組織では癌特異的に約8.7倍PBF遺伝子の発現が増加していることが示された。

実施例6

HLA-A*2402に結合する抗原ペプチドの同定

腫瘍抗原タンパク質PBFのアミノ酸配列（配列番号：2）中、HLA-A24結合性のモ

チーフ構造を有するペプチドである配列番号：6、7、8、10、26、27、28、29、30
および32に記載のアミノ酸配列からなるペプチドを合成した。TcOS2000c1-303の反
応性を指標にして、HLA-A* 2402に結合する抗原ペプチドの同定を試みた。前記い
ずれかのペプチドをパルスした293-EBNA-A24細胞をTcOS2000c1-303細胞と混合培養し
5、実施例2に記載の方法と同様にLDHリリースアッセイにより反応性を調べることに
より、HLA-A* 2402に結合する抗原ペプチドを同定することができる。

産業上の利用可能性

本発明により、腫瘍抗原タンパク質PBFおよびその遺伝子の、CTLの誘導剤として
10の用途などが提供される。本発明のCTLの誘導剤は、肉腫や腎癌等の患者を処置す
ることができる。

請求の範囲

1. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を有効成分として含有してなる、細胞傷害性T細胞（以下、CTL）の誘導剤。

2. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質の部分ペプチドであって、かつHLA抗原と結合してCTLにより認識されるペプチド。

3. HLA抗原がHLA-A24またはHLA-B55である、請求項2記載のペプチド。

4. 配列番号：6～配列番号：46のいずれかに記載のアミノ酸配列を含有する、請求項3記載のペプチド。

5. 配列番号：6～配列番号：45のいずれかに記載のアミノ酸配列の第2位のアミノ酸をチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファンに置換し、及び／又はC末端のアミノ酸をフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンに置換したアミノ酸配列を含有する、請求項3記載のペプチド。

6. 請求項2～5のいずれかに記載のペプチドを含有するエピトープペプチド。

7. 請求項2～6のいずれかに記載のペプチドを有効成分として含有してなるCTLの誘導剤。

8. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する核酸を含有してなる、CTLの誘導剤。

9. ポリヌクレオチドが配列番号：1、配列番号：1の第337位～第1878位、または配列番号：3に記載の塩基配列を含有するポリヌクレオチドである、請求項8記載のCTLの誘導剤。

10. 請求項2～6のいずれかに記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する核酸。

1 1. 請求項 10 記載の核酸を含有してなるCTLの誘導剤。

1 2. 以下の (a) ~ (d) :

(a) 配列番号: 2 に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、

5 (b) 上記 (a) 記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する核酸

、

(c) 請求項 2 ~ 6 のいずれかに記載のペプチド、および

(d) 上記 (c) 記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する核酸、
のいずれかと、抗原提示能を有する細胞とをイン・ビトロで接触させることを特徴
10 とする、抗原提示細胞の製造方法。

1 3. 請求項 1 2 記載の製造方法により製造される抗原提示細胞。

1 4. 以下の (a) ~ (d) :

(a) 配列番号: 2 に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質、

15 (b) 上記 (a) 記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する核酸

、

(c) 請求項 2 ~ 6 のいずれかに記載のペプチド、および

(d) 上記 (c) 記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する核酸、
のいずれかと、末梢血リンパ球とをイン・ビトロで接触させることを特徴とする、
20 CTLの誘導方法。

1 5. 請求項 1 4 記載の誘導方法により誘導されるCTL。

1 6. 請求項 2 ~ 5 のいずれかに記載のペプチドに特異的に結合する抗体。

1 7. 配列番号: 2 に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ
酸配列を含有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列において、
25 連続する少なくとも 15 塩基を含有するポリヌクレオチド及び／または該ポリヌク
レオチドに相補的なポリヌクレオチドからなる腫瘍マーカー。

1 8. 配列番号: 1 または配列番号: 3 に記載の塩基配列において、連続する
少なくとも 15 塩基を含有するポリヌクレオチド及び／または該ポリヌクレオチド
に相補的なポリヌクレオチドからなる、請求項 1 7 記載の腫瘍マーカー。

61

19. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質のアミノ酸配列において、連続する少なくとも8アミノ酸を含有するポリペプチドからなる腫瘍マーカー。

20. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、連続する少なくとも8アミノ酸を含有するポリペプチドからなる、請求項19記載の腫瘍マーカー。

21. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質に対する抗体、若しくは請求項16に記載の抗体からなる腫瘍マーカー。

22. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に対する抗体からなる、請求項21記載の腫瘍マーカー。

23. 請求項2～5のいずれかに記載のペプチドとHLA抗原とを含有するHLAテトラマー。

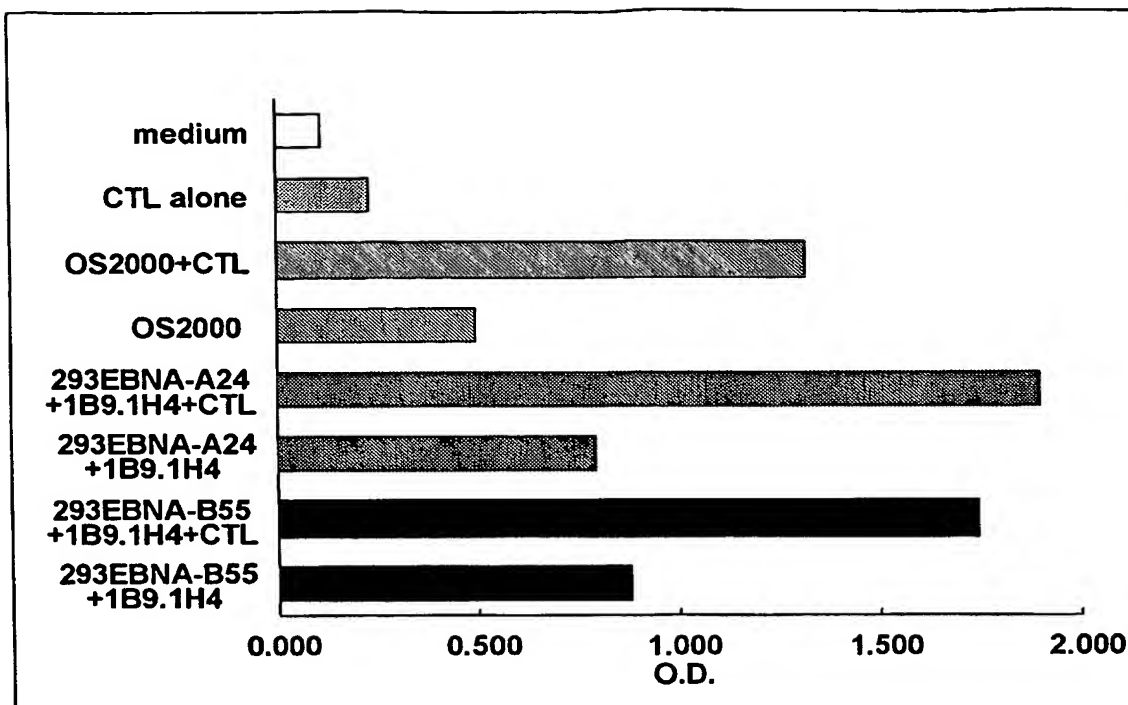
24. 請求項23記載のHLAテトラマーからなる腫瘍マーカー。

25. 腫瘍が肉腫または腎癌である、請求項17～22および請求項24のいずれかに記載の腫瘍マーカー。

26. 請求項17～22、請求項24および請求項25のいずれかに記載の腫瘍マーカーを含有してなる腫瘍の診断薬。

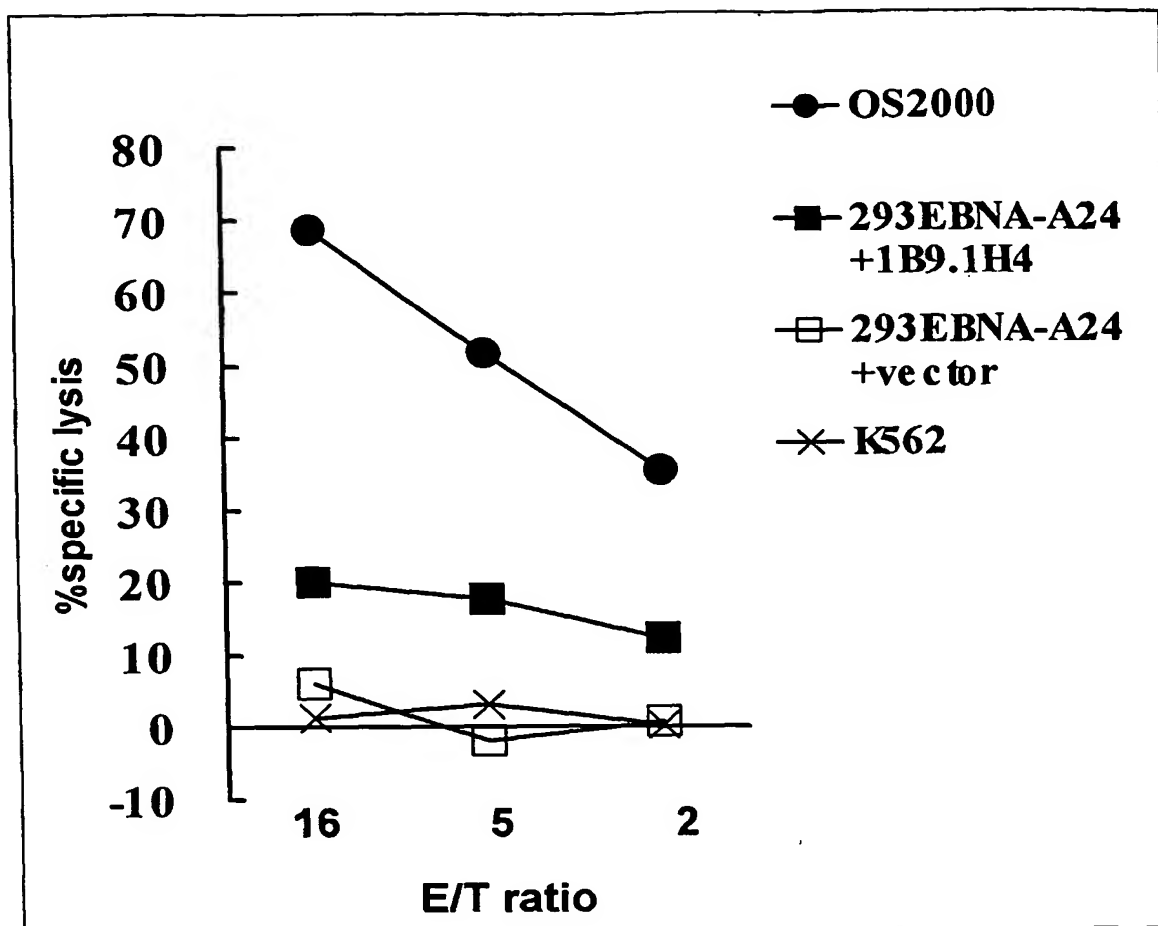
1/7

図 1



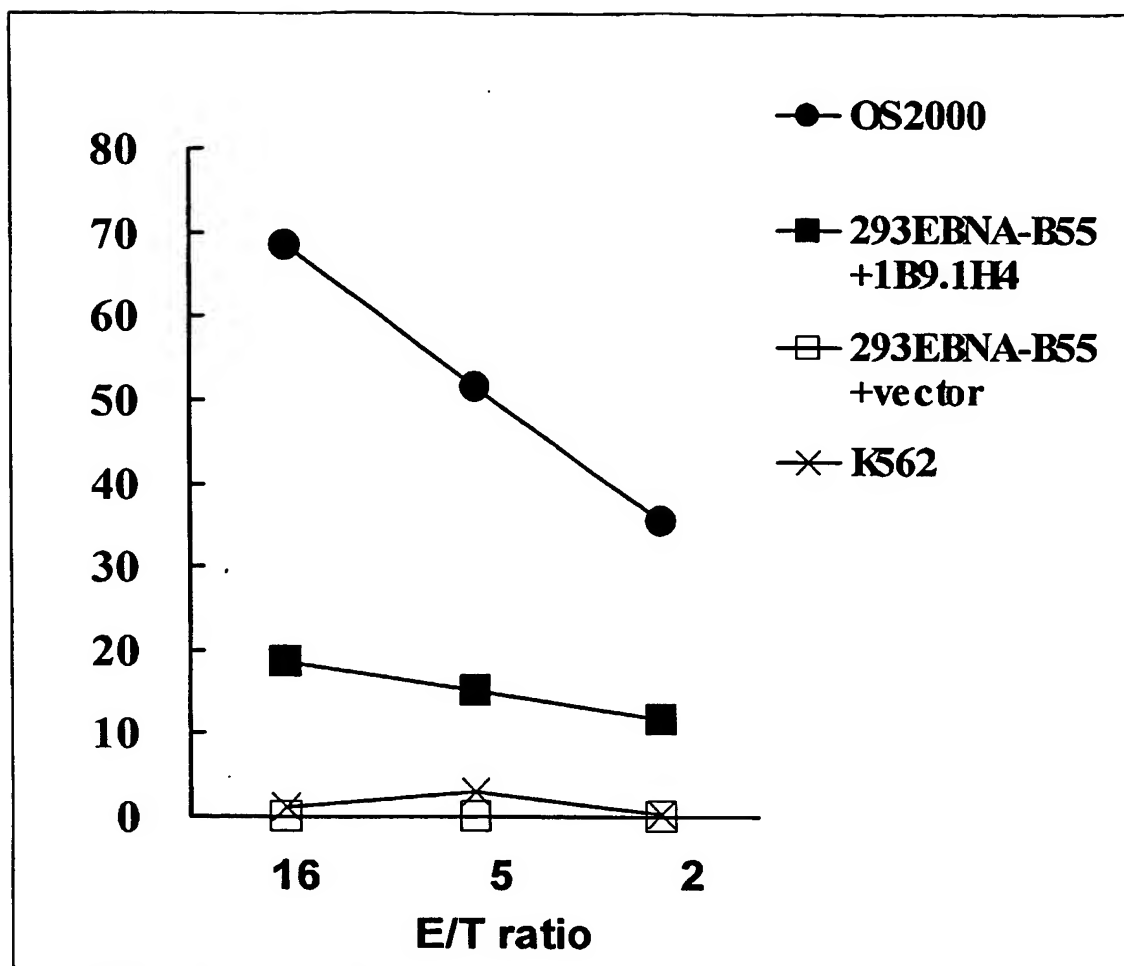
2/7

図 2 (A)



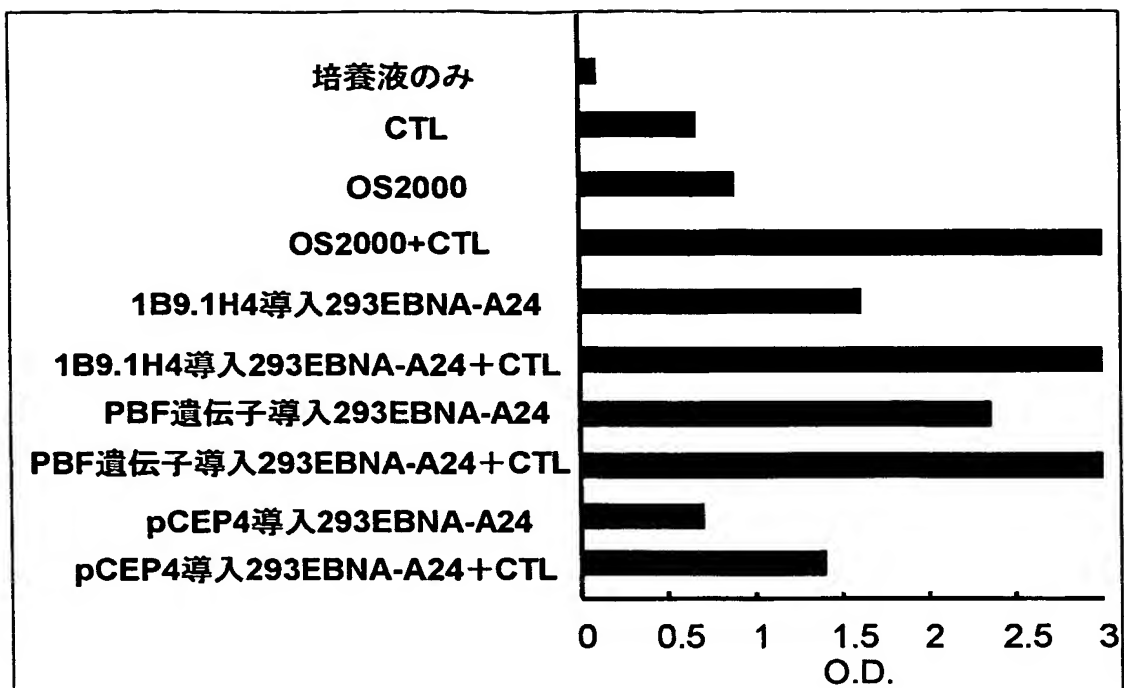
3/7

図 2 (B)



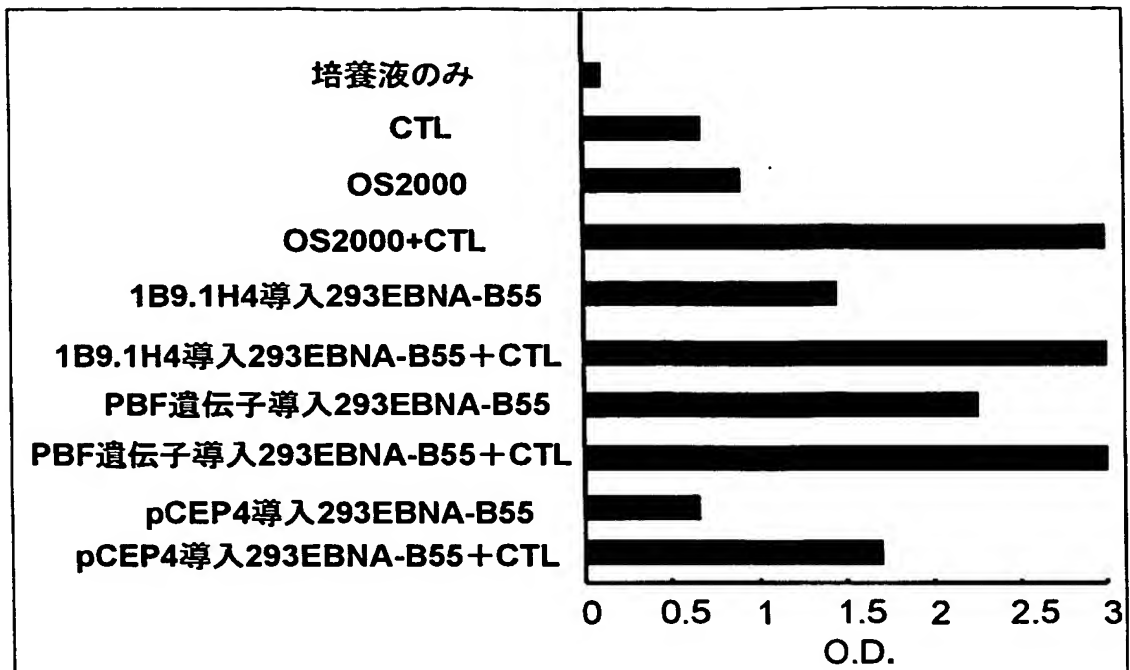
4/7

図 3



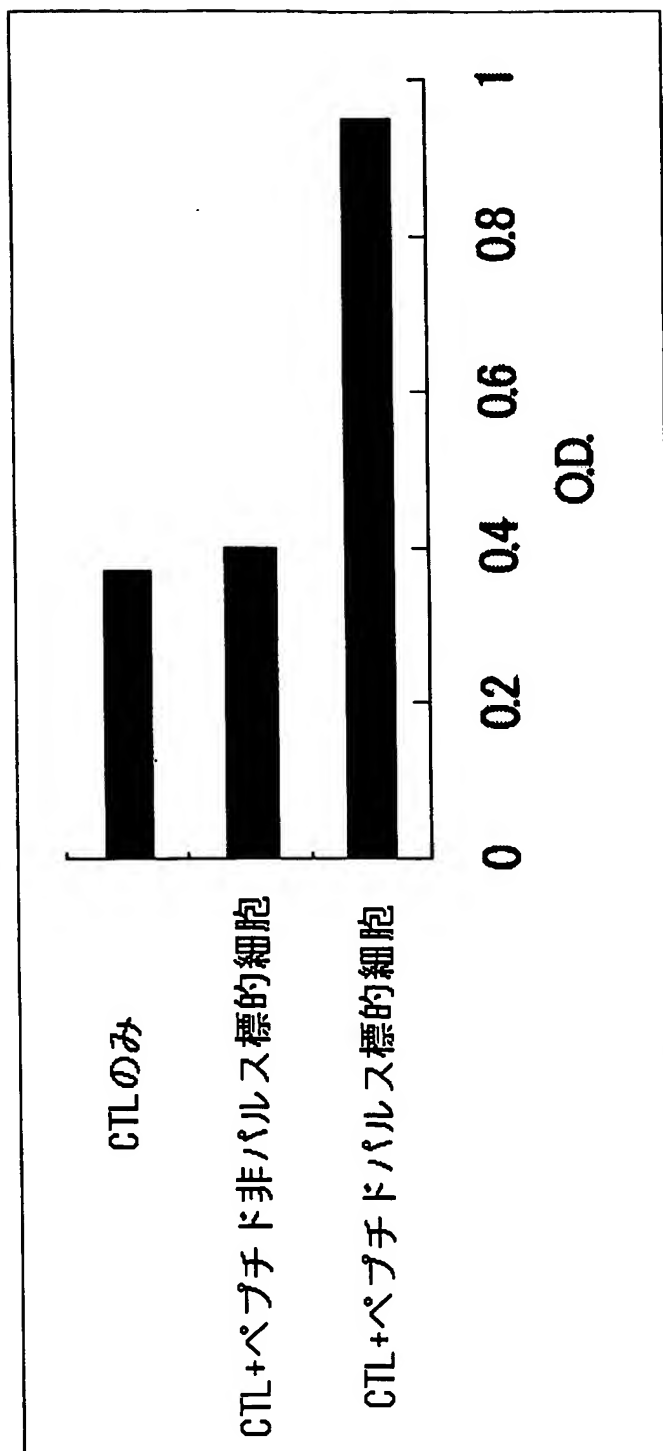
5/7

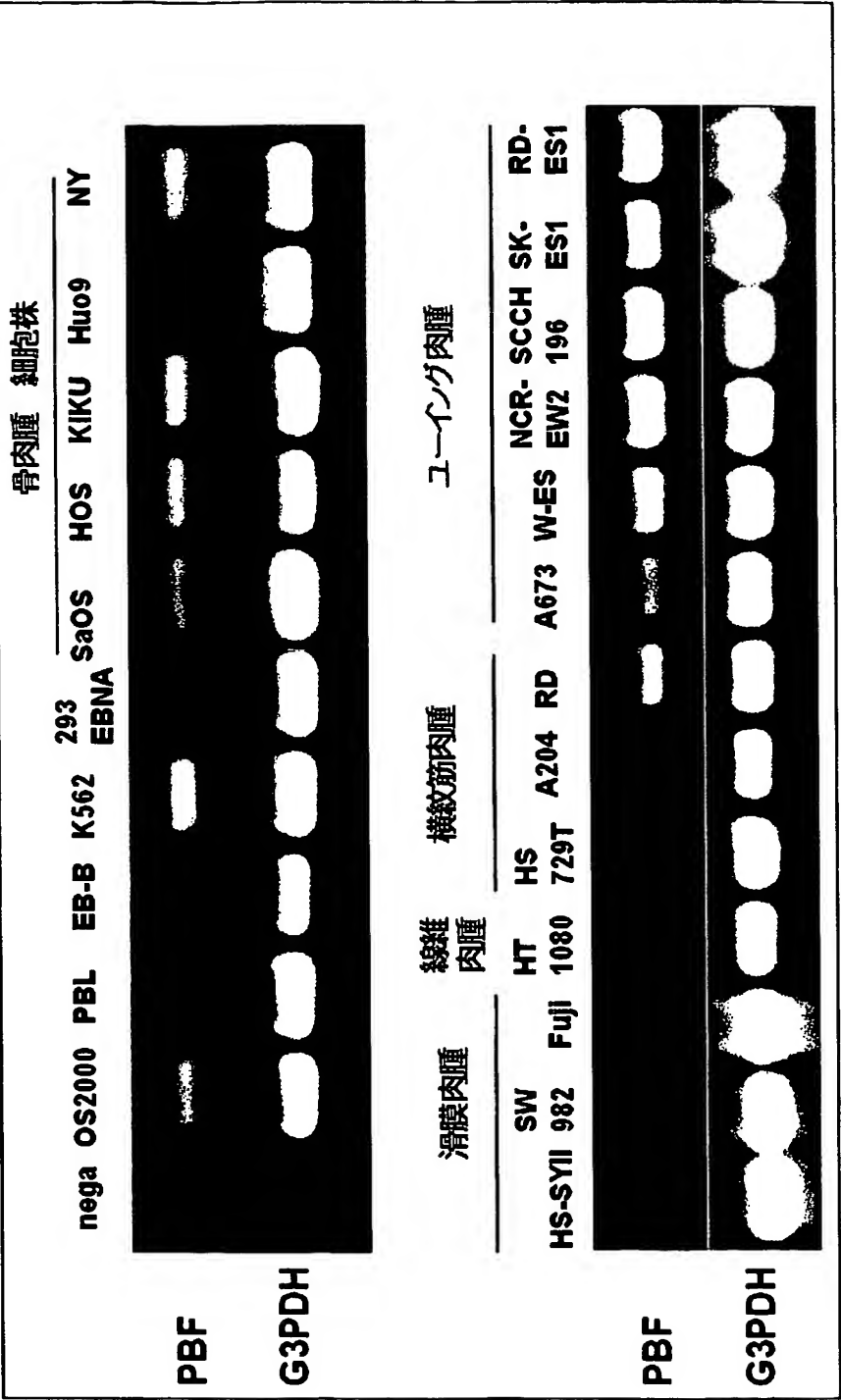
図 4



6/7

図 5





SEQUENCE LISTING

<110> Noriyuki, Sato
Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

<120> Tumor antigen proteins and its use

<130> 533618

<150> JP 2002-282345

<151> 2002-09-27

<160> 55

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2068

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (337).. (1878)

<400> 1

ctgcacaggg agtttgtctt gtgcaaaca tttccaaggc agcgttttct tccctgcctg 60

ggagtgcagg gctcagcgcc ttacttttg aactgactca gagacctaaa gaagcccacc 120

tggccagcgg gaaggggggc cgccgcccgc tcccggtttt gggcagccct ggccagctcc 180

ctgtggcctt ggaggacttc caccgggcag gcgttcccat gatgccaggc taccaggcgc 240

gggggattcc tgcaggccgg cgtgtctttt cttagaaccc cttttctaga aaagtacacc 300

tggaggtttt gcttcaaaga gaggagaggc agcagc atg gcg agt gtc ctg tcc 354
Met Ala Ser Val Leu Ser
1 5

cga cgc ctt gga aag cgg tcc ctc ctg gga gcc cgg gtg ttg gga ccc 402
Arg Arg Leu Gly Lys Arg Ser Leu Leu Gly Ala Arg Val Leu Gly Pro
10 15 20

2/24

| | |
|---|-----|
| agt gcc tcg gag ggg ccc tcg gct gcc cca ccc tcg gag cca ctg cta | 450 |
| Ser Ala Ser Glu Gly Pro Ser Ala Ala Pro Pro Ser Glu Pro Leu Leu | |
| 25 30 35 | |
| gaa ggg gcc gct ccc cag cct ttc acc acc tct gat gac acc ccc tgc | 498 |
| Glu Gly Ala Ala Pro Gln Pro Phe Thr Thr Ser Asp Asp Thr Pro Cys | |
| 40 45 50 | |
| cag gag cag ccc aag gaa gtc ctt aag gct ccc agc acc tcg ggc ctt | 546 |
| Gln Glu Gln Pro Lys Glu Val Leu Lys Ala Pro Ser Thr Ser Gly Leu | |
| 55 60 65 70 | |
| cag cag gtg gcc ttt cag cct ggg cag aag gtt tat gtg tgg tac ggg | 594 |
| Gln Gln Val Ala Phe Gln Pro Gly Gln Lys Val Tyr Val Trp Tyr Gly | |
| 75 80 85 | |
| ggt caa gag tgc aca gga ctg gtg gag cag cac agc tgg atg gag ggt | 642 |
| Gly Gln Glu Cys Thr Gly Leu Val Glu Gln His Ser Trp Met Glu Gly | |
| 90 95 100 | |
| cag gtg acc gtc tgg ctg ctg gag cag aag ctg cag gtc tgc tgc agg | 690 |
| Gln Val Thr Val Trp Leu Leu Glu Gln Lys Leu Gln Val Cys Cys Arg | |
| 105 110 115 | |
| gtg gag gag gtg tgg ctg gca gag ctg cag ggc ccc tgt ccc cag gca | 738 |
| Val Glu Glu Val Trp Leu Ala Glu Leu Gln Gly Pro Cys Pro Gln Ala | |
| 120 125 130 | |
| cca ccc ctg gag ccc gga gcc cag gcc ctg gcc tac agg ccc gtc tcc | 786 |
| Pro Pro Leu Glu Pro Gly Ala Gln Ala Leu Ala Tyr Arg Pro Val Ser | |
| 135 140 145 150 | |
| agg aac atc gat gtc cca aag agg aag tcg gac gca gtg gaa atg gat | 834 |
| Arg Asn Ile Asp Val Pro Lys Arg Lys Ser Asp Ala Val Glu Met Asp | |
| 155 160 165 | |
| gag atg atg gcg gcc atg gtg ctg acg tcc ctg tcc tgc agc cct gtt | 882 |
| Glu Met Met Ala Ala Met Val Leu Thr Ser Leu Ser Cys Ser Pro Val | |
| 170 175 180 | |
| gta cag agt cct ccc ggg acc gag gcc aac ttc tct gct tcc cgt gcg | 930 |
| Val Gln Ser Pro Pro Gly Thr Glu Ala Asn Phe Ser Ala Ser Arg Ala | |

3/24

| 185 | 190 | 195 | |
|---|-----|-----|------|
| gcc tgc gac cca tgg aag gag agt ggt gac atc tcg gac agc ggc agc | | | 978 |
| Ala Cys Asp Pro Trp Lys Glu Ser Gly Asp Ile Ser Asp Ser Gly Ser | | | |
| 200 | 205 | 210 | |
| agc act acc agc ggt cac tgg agt ggg agc agt ggt gtc tcc acc ccc | | | 1026 |
| Ser Thr Thr Ser Gly His Trp Ser Gly Ser Ser Gly Val Ser Thr Pro | | | |
| 215 | 220 | 225 | 230 |
| tcg ccc ccc cac ccc cag gcc agc ccc aag tat ttg ggg gat gct ttt | | | 1074 |
| Ser Pro Pro His Pro Gln Ala Ser Pro Lys Tyr Leu Gly Asp Ala Phe | | | |
| 235 | 240 | 245 | |
| ggt tct ccc caa act gat cat ggc ttt gag acc gat cct gac cct ttc | | | 1122 |
| Gly Ser Pro Gln Thr Asp His Gly Phe Glu Thr Asp Pro Asp Pro Phe | | | |
| 250 | 255 | 260 | |
| ctg ctg gac gaa cca gct cca cga aaa aga aag aac tct gtg aag gtg | | | 1170 |
| Leu Leu Asp Glu Pro Ala Pro Arg Lys Arg Lys Asn Ser Val Lys Val | | | |
| 265 | 270 | 275 | |
| atg tac aag tgc ctg tgg cca aac tgt ggc aaa gtt ctg cgc tcc att | | | 1218 |
| Met Tyr Lys Cys Leu Trp Pro Asn Cys Gly Lys Val Leu Arg Ser Ile | | | |
| 280 | 285 | 290 | |
| gtg ggc atc aaa cga cac gtc aaa gcc ctc cat ctg ggg gac aca gtg | | | 1266 |
| Val Gly Ile Lys Arg His Val Lys Ala Leu His Leu Gly Asp Thr Val | | | |
| 295 | 300 | 305 | 310 |
| gac tct gat cag ttc aag cgg gag gag gat ttc tac tac aca gag gtg | | | 1314 |
| Asp Ser Asp Gln Phe Lys Arg Glu Glu Asp Phe Tyr Tyr Thr Glu Val | | | |
| 315 | 320 | 325 | |
| cag ctg aag gag gaa tct gct gct gct gct gct gct gct gcc gca ggc | | | 1362 |
| Gln Leu Lys Glu Glu Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly | | | |
| 330 | 335 | 340 | |
| acc cca gtc cct ggg act ccc acc tcc gag cca gct ccc acc ccc agc | | | 1410 |
| Thr Pro Val Pro Gly Thr Pro Thr Ser Glu Pro Ala Pro Thr Pro Ser | | | |
| 345 | 350 | 355 | |
| atg act ggc ctg cct ctg tct gct ctt cca cca cct ctg cac aaa gcc | | | 1458 |

4/24

| | |
|---|------|
| Met Thr Gly Leu Pro Leu Ser Ala Leu Pro Pro Pro Leu His Lys Ala | |
| 360 | 370 |
| cag tcc tcc ggc cca gaa cat cct ggc ccg gag tcc tcc ctg ccc tca | 1506 |
| Gln Ser Ser Gly Pro Glu His Pro Gly Pro Glu Ser Ser Leu Pro Ser | |
| 375 | 390 |
| ggg gct ctc agc aag tca gct cct ggg tcc ttc tgg cac att cag gca | 1554 |
| Gly Ala Leu Ser Lys Ser Ala Pro Gly Ser Phe Trp His Ile Gln Ala | |
| 395 | 405 |
| gat cat gca tac cag gct ctg cca tcc ttc cag atc cca gtc tca cca | 1602 |
| Asp His Ala Tyr Gln Ala Leu Pro Ser Phe Gln Ile Pro Val Ser Pro | |
| 410 | 420 |
| cac atc tac acc agt gtc agc tgg gct gct gcc ccc tcc gcc gcc tgc | 1650 |
| His Ile Tyr Thr Ser Val Ser Trp Ala Ala Ala Pro Ser Ala Ala Cys | |
| 425 | 435 |
| tct ctc tct ccg gtc cgg agc cgg tcg cta agc ttc agc gag ccc cag | 1698 |
| Ser Leu Ser Pro Val Arg Ser Arg Ser Leu Ser Phe Ser Glu Pro Gln | |
| 440 | 450 |
| cag cca gca cct gcg atg aaa tct cat ctg atc gtc act tct cca ccc | 1746 |
| Gln Pro Ala Pro Ala Met Lys Ser His Leu Ile Val Thr Ser Pro Pro | |
| 455 | 470 |
| cgg gcc cag agt ggt gcc agg aaa gcc cga ggg gag gct aag aag tgc | 1794 |
| Arg Ala Gln Ser Gly Ala Arg Lys Ala Arg Gly Glu Ala Lys Lys Cys | |
| 475 | 485 |
| cgc aag gtg tat ggc atc gag cac cgg gac cag tgg tgc acg gcg tgc | 1842 |
| Arg Lys Val Tyr Gly Ile Glu His Arg Asp Gln Trp Cys Thr Ala Cys | |
| 490 | 500 |
| cgg tgg aag aag gcc tgc cag cgc ttt ctg gac tga gctgtgctgc | 1888 |
| Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln Arg Phe Leu Asp | |
| 505 | 510 |
| aggttctact ctgttcctgg ccctgccggc agccactgac aagaggccag tgtgtcacca | 1948 |
| gccctcagca gaaaccgaaa gagaaagaac ggaaacacgg agtttgggct ctgttggtta | 2008 |

5/24

aggtgtaaca cttaaagcaa ttttctccca ttgtgcgaac attttatttt ttaaaaaaaaa 2068

<210> 2

<211> 513

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Ser | Val | Leu | Ser | Arg | Arg | Leu | Gly | Lys | Arg | Ser | Leu | Leu | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Ala | Arg | Val | Leu | Gly | Pro | Ser | Ala | Ser | Glu | Gly | Pro | Ser | Ala | Ala | Pro |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Pro | Ser | Glu | Pro | Leu | Leu | Glu | Gly | Ala | Ala | Pro | Gln | Pro | Phe | Thr | Thr |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Ser | Asp | Asp | Thr | Pro | Cys | Gln | Glu | Gln | Pro | Lys | Glu | Val | Leu | Lys | Ala |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Pro | Ser | Thr | Ser | Gly | Leu | Gln | Gln | Val | Ala | Phe | Gln | Pro | Gly | Gln | Lys |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Val | Tyr | Val | Trp | Tyr | Gly | Gly | Gln | Glu | Cys | Thr | Gly | Leu | Val | Glu | Gln |
| | | | 85 | | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| His | Ser | Trp | Met | Glu | Gly | Gln | Val | Thr | Val | Trp | Leu | Leu | Glu | Gln | Lys |
| | | | 100 | | | | | | 105 | | | | 110 | | |
| Leu | Gln | Val | Cys | Cys | Arg | Val | Glu | Glu | Val | Trp | Leu | Ala | Glu | Leu | Gln |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Gly | Pro | Cys | Pro | Gln | Ala | Pro | Pro | Leu | Glu | Pro | Gly | Ala | Gln | Ala | Leu |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Ala | Tyr | Arg | Pro | Val | Ser | Arg | Asn | Ile | Asp | Val | Pro | Lys | Arg | Lys | Ser |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Asp | Ala | Val | Glu | Met | Asp | Glu | Met | Met | Ala | Ala | Met | Val | Leu | Thr | Ser |
| | | | 165 | | | | | | 170 | | | | 175 | | |
| Leu | Ser | Cys | Ser | Pro | Val | Val | Gln | Ser | Pro | Pro | Gly | Thr | Glu | Ala | Asn |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| Phe | Ser | Ala | Ser | Arg | Ala | Ala | Cys | Asp | Pro | Trp | Lys | Glu | Ser | Gly | Asp |
| | 195 | | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| Ile | Ser | Asp | Ser | Gly | Ser | Ser | Thr | Thr | Ser | Gly | His | Trp | Ser | Gly | Ser |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Ser | Gly | Val | Ser | Thr | Pro | Ser | Pro | Pro | His | Pro | Gln | Ala | Ser | Pro | Lys |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Tyr | Leu | Gly | Asp | Ala | Phe | Gly | Ser | Pro | Gln | Thr | Asp | His | Gly | Phe | Glu |
| | | | 245 | | | | | | 250 | | | | 255 | | |
| Thr | Asp | Pro | Asp | Pro | Phe | Leu | Leu | Asp | Glu | Pro | Ala | Pro | Arg | Lys | Arg |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |

6/24

Lys Asn Ser Val Lys Val Met Tyr Lys Cys Leu Trp Pro Asn Cys Gly
 275 280 285
 Lys Val Leu Arg Ser Ile Val Gly Ile Lys Arg His Val Lys Ala Leu
 290 295 300
 His Leu Gly Asp Thr Val Asp Ser Asp Gln Phe Lys Arg Glu Glu Asp
 305 310 315 320
 Phe Tyr Tyr Thr Glu Val Gln Leu Lys Glu Glu Ser Ala Ala Ala Ala
 325 330 335
 Ala Ala Ala Ala Ala Gly Thr Pro Val Pro Gly Thr Pro Thr Ser Glu
 340 345 350
 Pro Ala Pro Thr Pro Ser Met Thr Gly Leu Pro Leu Ser Ala Leu Pro
 355 360 365
 Pro Pro Leu His Lys Ala Gln Ser Ser Gly Pro Glu His Pro Gly Pro
 370 375 380
 Glu Ser Ser Leu Pro Ser Gly Ala Leu Ser Lys Ser Ala Pro Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Trp His Ile Gln Ala Asp His Ala Tyr Gln Ala Leu Pro Ser Phe
 405 410 415
 Gln Ile Pro Val Ser Pro His Ile Tyr Thr Ser Val Ser Trp Ala Ala
 420 425 430
 Ala Pro Ser Ala Ala Cys Ser Leu Ser Pro Val Arg Ser Arg Ser Leu
 435 440 445
 Ser Phe Ser Glu Pro Gln Gln Pro Ala Pro Ala Met Lys Ser His Leu
 450 455 460
 Ile Val Thr Ser Pro Pro Arg Ala Gln Ser Gly Ala Arg Lys Ala Arg
 465 470 475 480
 Gly Glu Ala Lys Lys Cys Arg Lys Val Tyr Gly Ile Glu His Arg Asp
 485 490 495
 Gln Trp Cys Thr Ala Cys Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln Arg Phe Leu
 500 505 510

Asp

<210> 3

<211> 1901

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ggctggcaga gctgcagggc ccctgtcccc aggcaccacc cctggagccc ggagcccagg 60
 ccctggccta caggcccgtc tccaggaaca tcgatgtccc aaagaggaag tcggacgcag 120
 tggaaatgga tgagatgatg gcggccatgg tgctgacgtc cctgtcctgc agccctgttg 180

7/24

```

tacagagtcc tcccgggacc gaggccaact tctctgcttc ccgtgcggcc tgcgacccat 240
ggaaggagag tggtagacatc tccgacagcg gcagcagcac taccagcggg cactggagtg 300
ggagcagtgg tgtctccacc cctcgcgcc cccaccccca ggccagcccc aagtatttgg 360
gggatgcttt tggttctccc caaactgata atggctttga gaccgatcct gaccctttcc 420
tgttggaaga accagctcca cgaagaaaga agaactctgt gaaggtgatg tacaagtgcc 480
tgtggccaaa ctgtggcaaa gttctgcgct ccattgtggg catcaaaca cacgtcaaag 540
ccctccatct gggggacaca gtggactctg atcagttcaa gcgggaggag gatttctact 600
acacagaggt gcagctgaag gaggaatctg ctgctgctgc tgctgctgct gccgcaggca 660
ccccagtcct tgggactccc acctccgagc cagctccccc cccagcatg actggcctgc 720
ctctgtctgc tcttccacca cctctgcaca aagcccagtc ctccggcccc gaacatcctg 780
gcccggagtc ctccctgccc tcaggggctc tcagcaagtc agctcctggg tccttctggc 840
acattcagga agatcatgca taccaggctc tgccatcctt ccagatccca gtctcaccac 900
acatctacac cagtgtcagc tgggctgctg cccctccgc cgctgctct ctctctccgg 960
tccggagccg gtcgctaagc ttcagcgagc cccagcagcc agcacctgcg atgaaatctc 1020
atctgatcgt cacttctcca ccccgggccc agagtgggtg caggtgagat gtccgctgtc 1080
gtcccttgcc ttctggtttc tgtgccctgt ctccagtggc gtggactccg accccacca 1140
gatgaagtca ccagggttag tcccagaga ggagcccaga tggcggtatg nccagatggg 1200
atgactgttt ggtcctcaga gcctctggcc cctggtcctg gtgacttttg ccgggagctg 1260
cccctttggc ctctgcttgt tctccagcc ccacttggcc actctcctgg gccaccacc 1320
tgtgtggggc tcgatttgca ttctctctt tctgcaggaa agcccaggag gaggctaaga 1380
agtgcgcgaa ggtgtatggc atcgagcacc gggaccagtg gtgcacggcg tgccggtgga 1440
agaaggcctg ccagcgcttt ctggactgag ctgtgctgca ggttctactc tgttcctggc 1500
cctgccggca gccactgaca agaggccagt gtgtcaccag cctcagcag aaaccgaaag 1560
agaaagaacg gaaacacgga gtttgggctc tgttggttaa ggtgtaaacac ttaaagcaat 1620
tttctcccat tgtgcgaaca ttttattttt taaaaaaaag aaacaaaaat atttttcccc 1680
ctaaaatagg agagagccaa aactgaccaa ggctattcag cagtgaacca gtgaccaaag 1740
aattaattac cctccgtttc ccacatcccc actctctagg ggattagctt gtgcgtgtca 1800
aaagaaggaa cagctcgctt tgcttcctgc tgagtcggtg aattctttgc tttctaaact 1860
cttcagaaaa ggactgtgag caagatgaat ttacttttct t 1901

```

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR Primer

<400> 4

tactagctag ctaaggcagc agcatggcga gtg

33

8/24

<210> 5
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR Primer

<400> 5

aaatatgctg cgcggccag gaacagagta gaac

34

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 6

Ala Tyr Arg Pro Val Ser Arg Asn Ile

1

5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 7

Asp Phe Tyr Tyr Thr Glu Val Gln Leu

1

5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT

9/24

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 8

Gly Phe Glu Thr Asp Pro Asp Pro Phe
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 9

Lys Tyr Leu Gly Asp Ala Phe Gly Ser
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 10

Arg Ser Leu Leu Gly Ala Arg Val Leu
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10/24

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 11

Ala Ala Pro Pro Ser Glu Pro Leu Leu

1

5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 12

Ile Tyr Thr Ser Val Ser Trp Ala Ala

1

5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 13

Thr Val Trp Leu Leu Glu Gln Lys Leu

1

5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

11/24

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 14

His Pro Gln Ala Ser Pro Lys Tyr Leu

1

5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 15

Leu Ser Pro Val Arg Ser Arg Ser Leu

1

5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 16

Met Tyr Lys Cys Leu Trp Pro Asn Cys

1

5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

12/24

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 17

Leu Trp Pro Asn Cys Gly Lys Val Leu
1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 18

Cys Gln Glu Gln Pro Lys Glu Val Leu
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 19

Ala Ala Pro Ser Ala Ala Cys Ser Leu
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic

13/24

Peptide

<400> 20

Glu Gly Gln Val Thr Val Trp Leu Leu

1

5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 21

Met Ala Ala Met Val Leu Thr Ser Leu

1

5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 22

Gly Pro Cys Pro Gln Ala Pro Pro Leu

1

5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

14/24

<400> 23

Ala Pro Thr Pro Ser Met Thr Gly Leu
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 24

Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln Arg Phe
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 25

Ser Ala Ala Pro Pro Ser Glu Pro Leu
1 5

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

15/24

<400> 26

Trp Tyr Gly Gly Gln Glu Cys Thr Gly Leu
1 5 10

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 27

Ala Tyr Gln Ala Leu Pro Ser Phe Gln Ile
1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 28

Gly Phe Glu Thr Asp Pro Asp Pro Phe Leu
1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 29

16/24

Arg Val Glu Glu Val Trp Leu Ala Glu Leu
1 5 10

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 30

Ser Phe Gln Ile Pro Val Ser Pro His Ile
1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 31

Val Tyr Val Trp Tyr Gly Gly Gln Glu Cys
1 5 10

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 32

Val Thr Val Trp Leu Leu Glu Gln Lys Leu

17/24

1

5

10

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 33

Trp Met Glu Gly Gln Val Thr Val Trp Leu
1 5 10

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 34

Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln Arg Phe Leu
1 5 10

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 35

Leu Pro Leu Ser Ala Leu Pro Pro Pro Leu
1 5 10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 36

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Gly | Ile | Lys | Arg | His | Val | Lys | Ala | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 |

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 37

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Ser | Val | Lys | Val | Met | Tyr | Lys | Cys | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 |

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 38

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Gly | Pro | Cys | Pro | Gln | Ala | Pro | Pro | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 |

19/24

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 39

Ile Gln Ala Asp His Ala Tyr Gln Ala Leu
1 5 10

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 40

Met Met Ala Ala Met Val Leu Thr Ser Leu
1 5 10

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 41

Ile Tyr Thr Ser Val Ser Trp Ala Ala Ala
1 5 10

20/24

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 42

Val Tyr Gly Ile Glu His Arg Asp Gln Trp

1 5 10

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 43

Ser Leu Ser Pro Val Arg Ser Arg Ser Leu

1 5 10

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 44

Ala Ala Ala Pro Ser Ala Ala Cys Ser Leu

1 5 10

<210> 45

21/24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 45

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Pro | Ala | Pro | Ala | Met | Lys | Ser | His | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 |

<210> 46

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 46

| | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Thr | Ala | Cys | Arg | Trp | Lys | Lys | Ala | Cys | Gln | Arg |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | |

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 47

| | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Thr | Ala | Cys | Arg | Trp | Lys | Lys | Ala |
| 1 | | | | 5 | | | | |

<210> 48

<211> 9

22/24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 48

Thr Ala Cys Arg Trp Lys Lys Ala Cys
1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 49

Ala Cys Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln
1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 50

Cys Arg Trp Lys Lys Ala Cys Gln Arg
1 5

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

23/24

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 51

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Thr | Ala | Cys | Arg | Trp | Lys | Lys | Ala | Cys |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 |

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 52

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Ala | Cys | Arg | Trp | Lys | Lys | Ala | Cys | Gln |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 |

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 53

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Cys | Arg | Trp | Lys | Lys | Ala | Cys | Gln | Arg |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 |

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 54

| | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Thr | Ala | Cys | Arg | Trp | Lys | Lys | Ala | Cys | Gln |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | |

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
Peptide

<400> 55

| | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Ala | Cys | Arg | Trp | Lys | Lys | Ala | Cys | Gln | Arg |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12037

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, 5/10, C12P21/02, C07K14/47, 7/06, 16/18,
A61K38/17, 38/08, 39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, 5/10, C12P21/02, C07K14/47, 7/06, 16/18,
A61K38/17, 38/08, 39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, MEDLINE (STN),
BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-------------------------------|
| X | EP 1136555 A1 (ITOH K.), 26 September, 2001 (26.09.01), In particular, Par. Nos. [0008] to [0010]; Example & WO 00/32770 A1 Page 3, lines 14 to 29; examples | 1-26 |
| P,X P,A | WO 2003/25138 A2 (EOS BIOTECHNOLOGY INC.), 27 March, 2003 (27.03.03), (Family: none) | 16-22, 25, 26 1-15, 23, 24 |
| P,A | Mammalian Gene Collection Program Team, Generation and initial analysis of more than 15,000 full- length human and mouse cDNA sequences, Proc.Natl. Acad.Sci.USA., 24 December, 2002 (24.12.02), Vol.99, No.26, p.16899-903 | 1-26 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search 22 October, 2003 (22.10.03) Date of mailing of the international search report 04 November, 2003 (04.11.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N15/12, 5/10, C12P21/02, C07K14/47, 7/06, 16/18, A61K38/17, 38/08, 39/395

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N15/12, 5/10, C12P21/02, C07K14/47, 7/06, 16/18, A61K38/17, 38/08, 39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2003年

日本国登録実用新案公報 1994-2003年

日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq

MEDLINE (STN) BIOSIS (STN) WPIDS (STN) JICST7714 (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X | EP 1136555 A1 (ITOH K) 2001. 09. 26, 特 に、[0008] - [0010], Example&WO 00/327 70 A1, 第3頁14-29行, 実施例 | 1-26 |
| PX | WO 2003/25138 A2 (EOS BIOTECHNOLOGY INC) 20 | 16-22, 25, 26 |
| PA | 03. 03. 27 (ファミリーなし) | 1-15, 23, 24 |
| PA | Mammalian Gene Collection Program Team, Generation and initial analysis of more than 15,000 full-len gth human and mouse cDNA sequences, Proc Natl Acad Sci U S A., 2002 Dec 24, Vol. 99, No. 26, p. 16899-9 03. | 1-26 |

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 10. 03

国際調査報告の発送日

04.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中晴絵

印

4N 973

電話番号 03-3581-1101 内線 348